

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年2月1日 (01.02.2001)

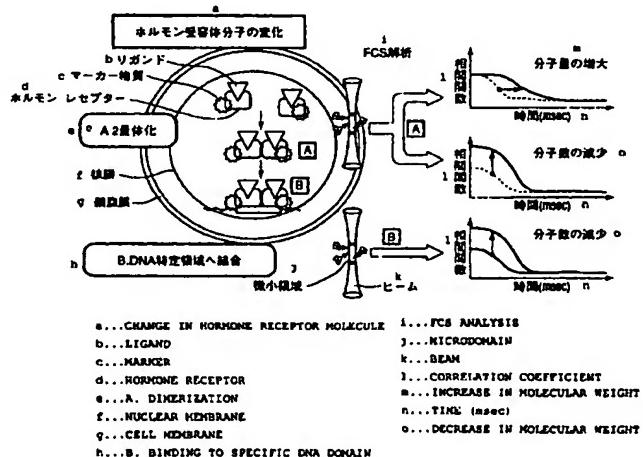
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/07919 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/68, C12N 15/09,  
C12Q 1/68, G01N 15/00, 21/78, 33/566
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 坂本宙子  
(SAKAMOTO, Hiroko) [JP/JP]; 〒141-0022 東京都品川区東五反田5-8-504 Tokyo (JP). 加藤則子(KATO,  
Noriko) [JP/JP]; 〒192-0046 東京都八王子市明神町  
4-23-11 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04930
- (22) 国際出願日: 2000年7月24日 (24.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 优先権データ:  
特願平11/209860 1999年7月23日 (23.07.1999) JP  
特願2000/163475 2000年5月31日 (31.05.2000) JP  
特願2000/163476 2000年5月31日 (31.05.2000) JP
- (74) 代理人: 鈴江武彦, 外(SUZUYE, Takehiko et al.); 〒  
100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴榮内  
外國特許法律事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): JP, US.
- (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (DE, FI, FR, GB, NL,  
SE).
- 添付公開書類:  
— 國際調査報告書
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): オリンパス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目  
43番2号 Tokyo (JP).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING SUBSTANCE INTERACTING WITH HORMONE RECEPTOR

(54) 発明の名称: ホルモンレセプターと相互作用する物質の検査方法



A1

WO 01/07919

(57) Abstract: A method for examining a substance interacting with a hormone receptor characterized by involving: (a) the step of maintaining a hormone receptor protein labeled with a marker capable of generating a light signal and a test substance under definite conditions such that the receptor protein can bind to the inherent ligand and, after binding to the inherent ligand, undergo a change in the state thereof so as to alter the detection properties of the light signal generated by the marker substance; (b) the step of detecting the light signal generated by the marker substance under the definite conditions as described above; and (c) the step of comparing the detection properties of the light signal detected in the above step (b) with the detection properties of the light signal detected from the marker in the absence of the test substance, and thus judging whether or not the test substance is a substance interacting with the above hormone receptor protein.

(統葉有)



---

(57) 要約:

ホルモンレセプターと相互作用する物質の検査方法であつて、(a) 光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質と被検物質とを、該レセプター蛋白質が本来のリガンドと結合することができ、且つ本来のリガンドと結合したときにその状態が変化して、前記マーカー物質から放出される光信号の検出特性を変化させるような所定の条件下に維持する工程と、(b) 前記所定条件下で前記マーカー物質から放出される光信号を検出する工程と、(c) 前記工程(b)で検出された光信号の検出特性と、前記被検物質の非存在下での前記マーカー物質から検出される光信号の検出特性とを比較し、その検出特性の変化に基づいて前記被検物質が前記ホルモンレセプター蛋白質と相互作用する物質であるか否かを判定する工程とを具備することを特徴とする検査方法。

## 明 細 書

## ホルモンレセプターと相互作用する物質の検査方法

## 技術分野

この発明は、ホルモンレセプター蛋白質と相互作用する物質（例えば、内分泌攪乱化学物質、いわゆる環境ホルモン）を検査する方法に関するものである。

## 背景技術

近年、環境中の化学物質による生物の内分泌系への影響に関する研究が活発化してきており、特に、内分泌攪乱化学物質に関する研究は重要な研究課題の一つである。内分泌攪乱化学物質、いわゆる環境ホルモンとは、内分泌系の機能に変化を与え、それにより個体やその子孫あるいは集団（亜集団）に有害な影響を引き起こす外因性の化学物質、あるいは混合物として定義される。そのおもな作用機序は、生体内に存在するホルモンレセプターに結合することにより、生体内本来のホルモンが結合するのを妨げたり、あるいは、不適切な偽のホルモンシグナルを発することにより、生体に悪影響を与えると考えられている。近年、内分泌攪乱化学物質は、従来の動物を用いた毒性試験では検出できないほどの低濃度で内分泌系を攪乱することがわかりつつある。しかしながら、その影響は単独の長時間暴露によるか、もしくは広範囲にわたる複合汚染によるなど、いまだにそのメカニズムは解明されていない。

今までこの作用機構が解明されていなかった背景には、内分泌攪乱化学物質が、従来の動物個体による毒性試験（致死

毒性、慢性臓器障害のみ検出可能な試験)では単独投与による傷害性、致死毒性を指標としており、内分泌系等に低濃度で作用する物質は検出できなかったことがある。そこで、OECDを始めとして国際的に、試験系スクリーニング法に関してガイドライン化を検討しているが、いまだ確定した方法に至っていない。

現在までに内分泌擾乱作用を有するとされている化学物質の多くが、女性ホルモンであるエストロゲン様の作用をもつことから、内分泌擾乱化学物質検出法においては、化学物質のエストロゲン様作用の有無を検出する目的のものが数多く開発されてきた。それらの化学物質はエストロゲンレセプターと結合することにより内分泌擾乱作用を及ぼすと考えられている。

そのようなエストロゲン様作用をもつ内分泌擾乱化学物質検出法の代表的なものとして、以下の方法が挙げられる。

#### ① レセプター結合性試験

調べたい化学物質(以下、被検物質という)とラジオアイソトープ標識した $\beta$ -エストラジオール(エストロゲンの一種)を、精製したエストロゲンレセプターに同時投与し、レセプター結合能の差を検出して内分泌擾乱性を検出する方法である。

この方法は、細胞を必要とせず、被検物質の内分泌擾乱性検出までにかかる時間が24時間以内であるという利点を有し、感度の点でも優れているが、放射性同位元素を用いるという難点がある。また、この方法では被検物質のレセプター

結合能の有無のみを評価するため、同物質が生体内での生理作用を真に誘発するか否かを評価することはできず、またその生理作用がアゴニスト性またはアンタゴニスト性の何れであるかを評価できないという難点がある。放射性同位元素を用いる難点を克服する方法として、近年、蛍光標識したエストロゲン（ $\beta$ -エストラジオール）を用いる検出法が開発された。しかし、生体内での生理作用がアゴニスト性またはアンタゴニスト性の何れであるかを評価することは依然として不可能なままである。この被検物質の生体内での具体的な生理作用を評価することは、特に合成ホルモン剤等の創薬において合成ホルモン剤等の化学物質の薬効を評価するうえで非常に重要なファクターであるため、被検物質の生理作用がアゴニスト性またはアンタゴニスト性の何れであるかをも評価できるアッセイ方法が望まれている。

## ② レポーター遺伝子アッセイ

エストロゲン応答配列（Estrogen Responsive Element）をもつレポーター遺伝子を導入した培養細胞に被検物質を投与し、該被検物質のおよぼす内分泌攪乱作用を、内分泌攪乱作用の最終産物であるレポーター遺伝子産物により検出定量する方法である。

この方法は、被検物質の内分泌攪乱性検出までにかかる時間が、上記①のレセプター結合性試験より長く、数日程度を必要とする。細胞としては、酵母やヒトの培養細胞が使用され、レポーター遺伝子としては $\beta$ -ガラクトシダーゼ等が一般的に利用されている。さらに、この手法では、レポーター

遺伝子産物を検出定量するための特別な試薬（レポーター遺伝子がβ-ガラクトシダーゼの場合は、その発光基質）が必要となる。加えて、この手法は内分泌攪乱作用の産物であるレポーター遺伝子産物の有無を検出指標としているため、被検物質の生体内での二つの生理作用、即ちアゴニスト性またはアンタゴニスト性のうち、アゴニスト性は評価できるが、アンタゴニスト性の評価は困難である。また、特に酵母細胞を使用した場合は、細菌による方法のため簡便であるが、細胞壁をもつため被検物質の細胞への透過性が低く、検出感度が著しく低下する可能性が高いという重大な欠点を有する。

### ③ 増殖増進試験

エストロゲンレセプター発現培養細胞に被検物質を投与し、細胞増殖増進の有無を検出する方法である。

この方法は、被検物質の内分泌攪乱性検出までにかかる時間が、上記②のレポーター遺伝子アッセイより長く、1週間程度を必要とする。この手法では、MCF-7、ISHIKAWA 等のエストロゲンレセプター発現培養細胞に被検物質を投与し、細胞の増殖を観察すると共に、その結果を、同様にβエストラジオールを投与した対照群と比較する。そして、被検物質により細胞増殖がどの程度増進されたかを指標として、被検物質の内分泌攪乱性の有無を検出する方法である。この手法は、上記①および②の手法とは異なり、特別な試薬等を必要としない点で簡素な手法であるといえる。しかし②のレポーター遺伝子アッセイと比較してはるかに多量の細胞を必要とするため、細胞の準備等の手間がかかる。また②のレポーター遺

伝子アッセイと同様に、この手法は、化学物質の生体内での生理作用（アゴニスト性またはアンタゴニスト性）のうち、アンタゴニスト性の評価は困難である。更に増殖活性のある物質（例えば、増殖因子、発癌プロモータ等）でも陽性となる偽陽性がでやすいという問題がある。

#### ④ 動物個体試験

上記①～③のような試験系では薬物動態（摂取、分布、代謝、排泄）が再現できない欠点がある。生体内環境をより適切に再現可能である動物個体試験には、子宮増殖アッセイ、Hershberger アッセイというげっ歯類による試験や両生類による方法があるが、いずれも数週間と時間がかかり、飼育等の設備やコストがかかる欠点、動物愛護に反する等の問題がある。さらに、化合物が相互作用する機能分子の動物種間差があり、得られた結果のヒトへの外挿性（実験で得られた値を人体へ適用しうる値に変換すること）が困難な場合がある。

よって、上述の①～④の試験系における種々の問題点を解消した、高感度、特異的な内分泌擾乱化学物質の検出方法が望まれるが、いまだ充分なものがない状況にある。

内分泌擾乱化学物質の検出方法に求められる要件としては、微量な分子を検出可能であること、人体に近いメカニズムを模倣していること、および設備、コスト、試験期間等の観点から簡便であることを同時に満足させることが挙げられる。

さてここで、エストロゲンレセプターとは、核内ホルモンレセプタースーパーファミリーに属する蛋白質であり、エストロゲンホルモン等のリガンドと結合することにより標的遺

伝子の発現を制御するリガンド誘導性転写制御因子である。

エストロゲンレセプターは、595 アミノ酸からなるエストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ ) しか知られていなかつたが、1996 年に、同じくエストロゲンをリガンドとし、ER $\alpha$  と高い相同意をもつ 530 アミノ酸からなるサブタイプが存在することがわかり、エストロゲンレセプター $\beta$  (ER $\beta$ ) と名付けられ、その遺伝子が単離された。

両者ともよく似た構造をもち、それらは機能的に 4 つのドメインに分けられる。すなわち、転写活性化能をもつ N 末端側の A / B (Activation Function-1 : AF-1) および C 末端側の E / F (Activation Function-2 : AF-2) の 2 つの領域、2 つの Zn フィンガーモチーフをもち DNA 結合能をもつ C 領域 (DNA binding domain : DBD) 、並びにエストロゲンレセプター自身が核内へ移行するためのシグナル (NLS) が存在する D 領域からなる。また、ホルモンレセプターの要であるリガンド結合領域は、E / F 領域に存在する。

エストロゲンレセプター $\alpha$  (以下 ER $\alpha$ ) とエストロゲンレセプター $\beta$  (以下 ER $\beta$ ) は、DNA 結合領域においては、たった 3 アミノ酸しか違わないという高い相同意をもつが、リガンド結合領域では 59 % の相同意を示すのみであることからそれが独自の異なるリガンドを認識しうることが示唆されている。

さらに、ER $\alpha$  と ER $\beta$  では発現している組織も異なり、また同一組織で発現していてもその発現時期等が異なる場合もあるという知見も得られている。このことから、ER $\alpha$  と

ER $\beta$ の果たす生物学的機能も異なると考えられている。

さらに興味深いことに、最近の知見 (J-A Gustafsson. Estrogen receptor  $\beta$  - a new dimension in estrogen mechanism of action. J.Endocrinology 163. 379-383 (1999)) では、ER $\beta$ は内分泌攪乱化学物質が作用を及ぼす標的器官である精巣あるいは卵巣等で高発現しており、特に精巣においてはER $\beta$ は精原細胞、精母細胞で高発現していることが判った。このことからER $\beta$ は、精子形成に重要な役割を果たしていることが示唆され、内分泌攪乱化学物質による精子数の減少、精子機能不全等は、ER $\alpha$ よりもむしろER $\beta$ を介した現象であるのではないかと予想されている。

以上より、内分泌攪乱化学物質は、ER $\alpha$ のみならず、むしろER $\beta$ を介して重大な作用をするものも多くあると考えられ、それらER $\beta$ をターゲットとする物質を効率よく検出することが可能な系が望まれている。

一方、先に述べた内分泌攪乱化学物質検出系で一般的に用いられている培養細胞株はMCF-7であるが、同細胞はER $\alpha$ を高発現している細胞であり、ゆえにER $\beta$ を特異的にターゲットとする物質は検出できないのが現状である。

さらに創薬の分野においてエストロゲンレセプターをターゲットとする化合物をスクリーニングする際、本発明のようにER $\alpha$ をターゲットとするものとER $\beta$ をターゲットとするものを区別して検出すれば、より組織特異的に働く化合物をスクリーニングすることが可能となり、より副作用の少ないホルモン治療薬の開発等につながるため、ER $\beta$ をターゲ

ットとする物質を効率よく検出することは大変有用なことである。

従って、本発明は、上記課題を解決し、ホルモンレセプター蛋白質と相互作用する物質を検査する上で、微量な分子の動きを検出可能であり、かつ生体に近い評価システムであつて、しかも簡便な評価システムの構築を目指す。

#### 発明の開示

本発明のホルモンレセプターと相互作用する物質の検査方法は、(a) 光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質と被検物質とを、該レセプター蛋白質が本来のリガンドと結合することができ、且つ本来のリガンドと結合したときにその状態が変化して、前記マーカー物質から放出される光信号の検出特性を変化させるような所定の条件下に維持する工程と、(b) 前記所定条件下で前記マーカー物質から放出される光信号を検出する工程と、(c) 前記工程(b)で検出された光信号の検出特性と、前記被検物質の非存在下での前記マーカー物質から検出される光信号の検出特性とを比較し、その検出特性の変化に基づいて前記被検物質が前記ホルモンレセプター蛋白質と相互作用する物質であるか否かを判定する工程とを具備することを特徴とする。

#### 図面の簡単な説明

図1は融合遺伝子発現プラスミドを示す模式図。

図2はGERb3-9-1プラスミドによる形質転換培養細胞系を示す顕微鏡写真。

図 3 はエストロゲン様内分泌攪乱物質の検出ストラテジーを表す図。

図 4 A 及び B は蛍光蛋白質の励起波長および蛍光波長の特性を示す図。

図 5 は F C S による検出に適した細胞を選択する手段の概要を示す図。

図 6 は蛍光量の違いによる F C S 計測結果を示す図。

図 7 は適正な蛍光強度を有する細胞を測定した際の自己相関関数を示す図。

図 8 は F C S 検出による細胞内の模式図。

図 9 は融合遺伝子の塩基配列の一部を示す図。

図 10 はフローサイトメトリー解析結果を示す図。

図 11 は G F P 遺伝子導入細胞の各クローンにおける平均蛍光強度を示すグラフ。

図 12 は Y F P 遺伝子導入細胞の各クローンにおける平均蛍光強度を示すグラフ。

図 13 は C F P 遺伝子導入細胞の各クローンにおける平均蛍光強度を示すグラフ。

図 14 は  $17\beta$  エストラジオール添加 0 分後および 45 分後の F C S 計測結果を示す図。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明では、生細胞で計測するためにリガンドでも被検物質でもなく、レセプターに対してマーカー物質を標識する。

本発明において、ホルモンレセプターは、それ自身の本来のリガンドと結合したときに、前記マーカー物質から発生す

る光信号の検出特性を変化させるような状態変化を生じさせるものであれば特に限定されない。従って、細胞膜に存在するレセプター、細胞質内に存在するレセプター、または核内に存在するレセプターの何れであってもよい。しかし、細胞質内に存在するレセプターが好ましく、核内に存在するレセプターがより好ましい。好ましいホルモンレセプターの例としては、核内ホルモンレセプタースーパーファミリーに属する蛋白質、例えばエストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、グルココルチコイドレセプター等が含まれる。特に好ましいレセプター蛋白質は、従来から内分泌攪乱化学物質の検出に用いられているエストロゲンレセプター蛋白質である。なかでも、従来技術に記載のように、ヒトエストロゲンレセプター $\beta$ （以下、h E R  $\beta$ ともいう）に対して内分泌攪乱作用を起こす物質の検出が期待されていることから、h E R  $\beta$ の遺伝子が最も好ましい。

本発明において、ホルモンレセプター蛋白質を標識するためのマーカー物質は、検出可能な光信号を発生する物質であれば特に限定されず、化学発光する物質、蛍光を発生する物質の何れを用いてもよい。しかし、細胞を生かしたまま細胞内のホルモンレセプター蛋白質の状態変化を観察することを考慮して勘案すると、マーカー物質としては、それ自体が細胞に対して毒性がなく、しかも基質を加えることなく光を発する物質、特に蛍光蛋白質が好ましく、これにはG F P (Green Fluorescent Protein)、C F P (Cyan Fluorescent

Protein)、YFP (Yellow Fluorescent Protein)、およびRFP (Red Fluorescent Protein) 等が含まれる。これら蛍光蛋白質は、後述するとおり周知の遺伝子組換え技術を用いることにより、ホルモンレセプター蛋白質との融合蛋白質として発現させることができる。

本発明において、ホルモンレセプター蛋白質の状態変化には、例えばホルモンレセプター蛋白質／被検物質の複合体の2量体化等による見かけの分子量の変化が含まれる。この状態変化は、單一段階の変化だけでなく、多段階での状態変化をも含むものであり、これら状態変化の夫々が、ホルモンの生理作用を発現させるためのシグナル伝達経路を構成するものである。

マーカー物質から放出される光信号の検出特性の変化とは、検出される光信号の波長の変化、もしくは検出される光信号の細胞内分布（局在）の変化、または相関蛍光分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy；以下FCSと略す)において検出される蛍光強度の変化等が含まれるが、これに限定されるものではない。何れにしても、この光信号の検出特性の変化は、ホルモンレセプターが本来のリガンドと結合したときの状態変化に起因するものでなければならない。

なお、FCSとは、蛍光で標識した標的分子の媒質中におけるゆらぎ運動を測定し、自己相関関数(Autocorrelation function)を用いることにより、個々の標的分子の微小運動を正確に測定する技術である（参照文献：D. Magde and E. Elson, “Fluorescence correlation spectroscopy. II.

An experimental realization" , Biopolymers 13(1) 29-61)。本発明におけるFCSの適用を原理的に説明すれば、次の通りである。FCSでは、試料中の微小視野領域から発生する蛍光信号を顕微鏡で検出定量する。この時、蛍光標識した標的分子は媒質中で運動しているから、標的分子がこの微小視野領域内に入ってくる頻度および前記領域内にとどまる時間に応じて、検出される蛍光強度は変化する。従って、例えば2量体化によって見かけの分子量が増大すれば、標的分子の運動は遅くなり、見かけの分子数も減少するため、微小視野領域内に入ってくる頻度が低下し、観察される蛍光強度は変化する。その蛍光強度の変化によって、標的分子の見かけの分子量変化を追跡することが可能になる。

微小な領域で分子ゆらぎを捕えるFCS解析は、高感度、特異的に分子間相互作用を検出する上で有効である。具体的に、FCSは、溶液中の蛍光分子のブラウン運動をレーザー共焦点顕微鏡により微小領域で捉えることによって、蛍光強度のゆらぎから拡散時間を解析し、物理量（分子の数、大きさ）を測定する方法である。

FCSにより細胞内の生体分子の挙動を計測するには、細胞の機能が損なわれないまま、目的の生体分子が蛍光を発するようなマーカー物質で標識されていることが必要であるが、従来そのような蛍光を発するマーカー物質（FITC、ローダミン、Cy3(アマシャム ファルマシア社)、Cy5(アマシャム ファルマシア社)、PI(プロピジウム・イオダイド))は細胞に対して毒性を示すものが多く、したがって細胞内の生体分子

を F C S にて計測することは困難であった。

F C S の生物学的応用例に関しては、Cell Mol. Biol. 44(5), 857-879 (1998) ; Biochemistry, 37, 12971-12978 (1998) に報告されているが、F C S を、細胞内レセプター解析のために蛍光標識したレセプターに適応し、ホルモンレセプターと相互作用する物質（例えば内分泌攪乱化学物質）のスクリーニングに特化させた発明はこれまでにない。

本発明において、所定の条件とは、上記ホルモンレセプターが本来のリガンドと結合し、上記のような状態変化を生じ得る条件を意味し、培養細胞内あるいは試験管内の溶液中の何れであってもよい。培養細胞内の系を採用する場合は、MCF-7、HeLa 等のヒト培養細胞のほか、チャイニーズハムスター由来のCHO 細胞等のヒト以外の哺乳動物細胞でもよい。

本発明において、被検物質とは、前記ホルモンレセプターに対する本来のリガンド以外の化学物質を意味する。従って、内分泌攪乱性が疑われている如何なる化学物質をも使用することができる。

本発明において、上記被検物質を添加した後、前記所定の条件を維持することにより、もし前記被検物質が前記ホルモンレセプターに対する内分泌攪乱因子であれば、被検物質は前記ホルモンレセプターに結合する。その結果、本来のリガンドの場合と同様の一連の生化学反応を生じ、当該レセプターの状態変化および前記マーカー物質が発生する光信号が変化する。従って、この光信号の変化を検出することによって、前記被検物質が内分泌攪乱化学物質であることが分かる。も

し、被検物質の添加の前後で検出される光信号に変化がなければ、該被検物質は当該ホルモンレセプターとは相互作用せず、従って前記ホルモンレセプターに関する内分泌攪乱化学物質でないことが分かる。

本発明の好ましい態様において、まず、生体に近いメカニズムを模倣するため、蛍光標識されたホルモンレセプターを細胞内で発現させる。この点において、リガンドの方を標識していた従来例とは大きく相違する。

即ち、①生体内に存在するホルモンレセプター蛋白質をコードする遺伝子と光信号を発生し得るマーカー物質をコードする遺伝子との融合遺伝子を作製するとともに、該融合遺伝子を含む発現ベクター（以下、発現プラスミドともいう）を構築する。次いで、②前記融合遺伝子を含む発現ベクターを培養細胞に導入し、細胞内で、ホルモンレセプター/光信号を発生し得るマーカー物質の融合蛋白質を発現させる。次いで、③前記ホルモンレセプター/マーカー物質の融合蛋白質を発現する細胞に被検物質を投与し、その後に誘発される前記融合蛋白質を介した細胞内シグナル伝達を、F C Sあるいは蛍光顕微鏡を用いて細胞の内側領域に合焦点を位置させて所定時間光信号を測定する工程によって検出することにより、被検物質とレセプター分子の相互作用を検出し、被検物質の内分泌攪乱性を評価する。ここで細胞の内側領域とは、細胞内の全領域であっても細胞内的一部の領域であってもよく、細胞内的一部の領域である場合、細胞内の任意の領域であり得る。F C Sによる測定の場合、細胞内的一部の特定領域を

測定することとなる。

以下、上記①～③の順に詳細に説明する。

### ① 融合遺伝子の作製および発現プラスミドの構築

本発明において使用される、ホルモンレセプター蛋白質をコードする遺伝子は、上述したとおり、ホルモンレセプター蛋白質が本来のリガンドと結合したときに発生する光信号が、リガンド結合前の光信号と比較して、検出可能な変化により捉えられるものであればよい。また、上述のように、ヒトエストロゲンレセプター $\beta$ （以下、hER $\beta$ ともいう）に対して内分泌擾乱作用を起こす物質の検出が期待されていることから、hER $\beta$ の遺伝子が最も好ましい。しかし本発明において、ホルモンレセプター蛋白質をコードする遺伝子は、hER $\beta$ の遺伝子に限定されるものではない。

本発明においてホルモンレセプター蛋白質をコードする遺伝子は、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするコード領域、即ち開始コドンから終止コドンまでの遺伝子配列を少なくとも含んでいればよく、ホルモンレセプター蛋白質の発現に支障をきたさない限り、開始コドンの上流配列および終止コドンの下流配列を任意の長さで含むことができる。

例えばヒトエストロゲンレセプター $\beta$ 遺伝子（配列番号1にcDNAの配列を記載）の場合、コード領域である99～1688位の塩基配列を少なくとも含んでいればよい。本発明において実際に作製された融合遺伝子は、後述の実施例に記載のように、hER $\beta$ 遺伝子の53～1735位の配列を含むものである。しかし、融合遺伝子内におけるhER $\beta$ 遺伝子の

配列の長さは、h E R  $\beta$  遺伝子のクローニング条件、および融合遺伝子の作製条件に応じて変化するものであるから、h E R  $\beta$  遺伝子の配列の長さは、下記の実施例で作製されたものに限定されるべきではない。

本発明において、上述のホルモンレセプター遺伝子と融合されるマーカー物質をコードする遺伝子は、検出可能な光信号を発生する物質の遺伝子であれば特に限定されず、化学発光する物質、蛍光を発生する物質の何れをコードする遺伝子を用いててもよい。また、マーカー物質をコードする遺伝子は、マーカー物質を発現させることが可能であれば、該遺伝子のコード領域を含む任意の長さでよい。

マーカー物質の遺伝子としては、蛍光蛋白質の遺伝子が好ましく、これにはG F P (Green Fluorescent Protein)、C F P (Cyan Fluorescent Protein)、およびY F P (Yellow Fluorescent Protein)の遺伝子等が含まれる。これら蛍光蛋白質の遺伝子は、融合遺伝子の作製および融合遺伝子の発現の観点から、発現ベクターに組み込まれた市販のものを利用することが望ましい。

上述のホルモンレセプターをコードする遺伝子とマーカー物質をコードする遺伝子との融合は、まず所望のホルモンレセプター遺伝子をクローニングし、発現ベクターに予め組み込まれたマーカー物質遺伝子と前記レセプター遺伝子とをライゲーションさせることにより行うことができる。

ライゲーションさせるために、マーカー物質遺伝子とレセプター遺伝子との間のつなぎ部分は、任意のマルチクローニ

ングサイト配列を含む。この配列は、制限酵素による切断、およびリガーゼによるライゲーションを可能にする配列であって、且つ融合蛋白質の発現に支障をきたさない程度の長さであれば特に限定されない。

マーカー物質遺伝子を予め組み込んだ発現ベクターは、市販のものを用いると簡便であり、このような発現ベクターの例として図1に示すpEGFP-C1が挙げられる。このベクターは、マーカー物質遺伝子として緑色蛍光蛋白質の遺伝子（図中、EGFP）を含み、該EGFP遺伝子の下流にマルチクローニングサイト（図中、MCS）を有する。該MCSに任意の遺伝子を挿入することでEGFP遺伝子との融合遺伝子を作製することができる。さらに融合遺伝子は、その上流にあるプロモーター（図中、PCMV IE）の制御により、哺乳類培養細胞内で強力に発現され得る。またこのベクターは、薬剤耐性マーカー遺伝子（図中、Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup>）を含み、該遺伝子は、当該ベクターを組み込んだ細胞の選択のために利用できる。尚、発現ベクターに予め組み込まれたマーカー物質遺伝子と前記レセプター遺伝子とをライゲーションさせるには、発現ベクターの保持するマルチクローニングサイトが継ぎ目の役割を果たす。

このように、マーカー物質遺伝子を含む所望の発現ベクターを利用することにより、融合遺伝子の作製および発現プラスミドの構築を行うことができる。

## ② 発現プラスミドによる細胞の形質転換、および融合蛋白質の発現

上述のとおり構築された融合遺伝子を含む発現プラスミドを用いて、細胞の形質転換を行う。形質転換される細胞は、ヒトにおける内分泌擾乱作用を評価することを目的とするため、ヒト培養細胞を使用することが好ましく、一例としてヒト乳がん組織由来培養細胞株が挙げられる。形質転換は、公知の方法、例えばリポフェクション法、リン酸カルシウム法、電気穿孔法等により行うことができるが、後述の実施例に記載のリポフェクション法が、プラスミドDNAの導入効率の観点から好ましく使用される。

上述のとおり形質転換を行った細胞の中から、薬剤耐性の形質転換細胞を選択することにより、安定した形質転換細胞系を樹立することができる。即ち本発明において好ましくは、上述のとおり、発現プラスミドとして薬剤耐性マーカー遺伝子を含むものを使用することにより、形質転換細胞の選択を行う。

このように形質転換された細胞は、発現プラスミド中のプロモーターの制御下で融合遺伝子を発現する。発現される融合蛋白質は、光信号を発生し得、かつホルモンレセプターの機能も保持し得る融合蛋白質であり、このような蛋白質である限りそのアミノ酸配列において、一もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもよい。

### ③ ホルモンレセプターに対する内分泌擾乱性の検出

上述のホルモンレセプター/マーカー物質の融合蛋白質を発現している細胞もしくは精製された融合蛋白質に、被検物質を投与し、その後に誘発されるホルモンレセプター蛋白質

の状態変化を F C S あるいは光学顕微鏡で検出することにより、被検物質の内分泌攪乱性を評価することができる。

以下、本発明の好ましい態様である、エストロゲンレセプター/マーカー物質の融合蛋白質を発現している細胞もしくは精製された融合蛋白質に、被検物質を投与し、被検物質の内分泌攪乱性を評価する場合を説明する。

まず、エストロゲンレセプター、およびその働く機構について説明する。

エストロゲンレセプターは、上述のとおり、核内ホルモンレセプタースーパーファミリーに属する蛋白質であり、エストロゲン等のリガンドと結合することにより標的遺伝子の発現を制御するリガンド誘導性転写制御因子である。

エストロゲンレセプター蛋白質は、細胞質で生成された後すみやかに核内に移行し、通常は核内に局在する。本発明においても図 2 に示すとおり、エストロゲンレセプター蛋白質の核内への局在は証明されている。

細胞膜を通過し細胞内に流入したリガンド（例えばエストロゲン）がエストロゲンレセプターに結合すると、レセプターは 2 量体を形成する。この 2 量体は、核内 DNA の特定の塩基配列（エストロゲン応答配列：E R E）を認識して結合し、レセプター/DNA 複合体を形成する。このレセプター/DNA 複合体は、核内に存在するコアクチベーターにより活性化され、E R E 下流に存在する遺伝子の転写が促進される。

上述のエストロゲンレセプターの働くしくみをふまえ、エ

ストロゲン様内分泌攪乱物質は、図3に示す3つの各段階、即ち

(1) エストロゲン様内分泌攪乱物質が、エストロゲンレセプター（以下ERとする）に結合することによりERが2量体化する段階I、

(2) 2量体化したERが、染色体DNA上のエストロゲン応答配列（以下EREともいう）に結合する段階II、

(3) ER/ERE複合体が活性化され、ERE下流の遺伝子が発現する段階III

において検出可能であると考え、以下のような内分泌攪乱物質の検出方法を考案した。

ホルモンレセプターモノクローナル抗体の細胞内シグナル伝達をFCSにより検出した模式図を、図8に示す。図8は、(A) 2量体化による分子量の増大および分子数の減少、並びに(B) DNA特定領域への結合による分子数の減少が、FCSにより自己相関関数の変化として検出されることを示している。

(1) ERが2量体化する段階Iでの検出

〈FCSで検出する場合〉

上述の融合蛋白質の合成法に従い、ER遺伝子と緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子の融合遺伝子を作製して細胞に導入することにより、細胞内でER/GFP融合蛋白質を発現させる。ERがリガンド(エストロゲン様内分泌攪乱物質)と結合し2量体になるのを、ER/GFP融合蛋白質分子の分子量の変化および分子数の変化としてFCSでとらえることができる(図8のA(2量体化)を参照)。

なお、上記FCSでの検出は、細胞内で発現させたER/GFP融合蛋白質を細胞より抽出、精製したものを用いてもよい。

〈蛍光波長の変化として（蛍光顕微鏡等で）検出する場合〉

ERは、現在までに $\alpha$ 、 $\beta$ 2種類のサブタイプ（ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ）が知られており、 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ の2量体を形成する。

そこで、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 遺伝子について、それぞれ蛍光蛋白質CFP（Cyan Fluorescent Protein、極大励起波長433、453nm／極大蛍光放射波長475、501nm）、およびYFP（Yellow Fluorescent Protein、極大励起波長513nm／極大蛍光放射波長527nm）遺伝子と融合遺伝子を作製し、ER $\alpha$ /CFP、ER $\beta$ /YEP融合蛋白質を合成する。蛍光蛋白質CFPおよびYFPの励起波長および蛍光波長の特性を図4に示す。

ER $\alpha$ /CFP融合蛋白質は、453nmの光を照射することにより501nmの蛍光を放射するが、ER $\beta$ /YEP蛋白質は、453nm付近の照射では励起されず蛍光を放射しない。したがって、リガンドがない状態では、それぞれの融合蛋白質は単体として存在するため、453nm付近の照射では、ER $\alpha$ /CFPのみが励起され青色の蛍光を発する。

一方、リガンド存在下でER $\alpha$ /CFP、ER $\beta$ /YEPの2量体が形成されると、同様に453nmの光を照射した場合、まずER $\alpha$ /CFP融合蛋白質から501nmの蛍光が放

射され、ついでこの蛍光は、2量体形成のため非常に近い位置に存在するER $\beta$ ／YEP融合蛋白質を励起し、ER $\beta$ ／YEPから527nm付近の黄色の蛍光が放射されるようになる。よって、453nm付近の照射により、527nm付近の蛍光が得られるかどうかで、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の2量体化の有無をモニターすることができ、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の2量体化を放射蛍光波長の変化として検出できる。

なお、CFPとYFPを用いて、それぞれ別々のER $\alpha$ を、あるいは別々のER $\beta$ を標識することで、 $\alpha\alpha$ の2量体あるいは $\beta\beta$ の2量体を検出するようにしてもよい。

#### (2) エストロゲン応答配列(ERE)に結合する段階IIでの検出

##### 〈細胞内の系の場合〉

ER遺伝子とGFP遺伝子の融合遺伝子を作製して細胞に移入することにより、細胞内でER／GFP融合蛋白質を発現させる。

ERがリガンド(エストロゲン様内分泌攪乱物質)と結合し2量体になり、さらに核内の染色体DNAのERE配列に結合するのを、核内のER／GFP融合蛋白蛍光分子の分子数の変化、即ち核内に浮遊するER／GFP融合蛋白蛍光分子数の減少としてFCSでとらえることができる(図8のB(DNA特定領域へ結合)を参照)。

また、蛍光分子が発する光信号の細胞内分布の変化により検出できる。即ち、核内のER／GFP融合蛋白蛍光分子が、染色体DNAのERE配列に結合している状態を、ERE配

列に非結合の状態（核内に浮遊している状態）との蛍光の核内分布の違いにより蛍光顕微鏡で検出することができる。

なお、上記FCSでの検出は、以下に記載するように、細胞内で発現させたER/GFP融合蛋白質を細胞より抽出、精製したものを用いてもよい。

〈細胞フリーの系の場合〉

ER遺伝子とGFP遺伝子の融合遺伝子を作製し、ER/GFP融合蛋白質を大量に合成、精製し、一方、EREである15merのオリゴヌクレオチドも合成しておく。これら両者と一緒に溶液中に懸濁して細胞フリーのER/ERE系を構築し、そこに被検物質を添加する。ERがリガンドと結合し2量体になり、ERE分子と結合するのを、ER/GFP融合蛋白蛍光分子の構造の変化、および分子量の変化として、例えばFCSでとらえることができる。

(3) 標的遺伝子が転写および翻訳される段階 IIIでの検出

ER/GFP融合遺伝子の細胞内への導入に加えて、光マーカー物質を発現しうる遺伝子によるレポーター遺伝子をさらに細胞に導入し、ERがリガンドと結合することにより光マーカー物質をコードする遺伝子が転写されるような構成を築く。即ち、エストロゲン応答配列を発現制御領域に有し、かつ光マーカー物質を発現しうるレポーター遺伝子を培養細胞に導入したアッセイ系を構築する。被検物質を投与した際の、レポーター遺伝子産物である光マーカー物質の蛍光量を、FCS、蛍光顕微鏡、マイクロプレートリーダー等で検出す

ることによりエストロゲン様内分泌攪乱物質を検出することができる。

なお、上述の検出方法における融合蛋白質の作製には、GFPのほか、CFP、YEP等その他の蛍光蛋白質を利用してよい。並びにレポーター遺伝子に使用する蛍光蛋白質も同様である。また、レセプター分子のほうも、エストロゲンレセプターのほか、グルココルチコイドレセプター等、その他ホルモンレセプターも利用できる。

以上、説明したとおり本発明においては、細胞内でのホルモンレセプター分子の経時的な動きを捉えるため、生きたままの状態で細胞内のレセプター分子を標識することを試みた。そのため本発明は、上述のとおり、蛍光物質の遺伝子とホルモンレセプター遺伝子との融合遺伝子を発現させる手段を採用する。

一方、これまでFCS解析は専ら非細胞系溶液における蛍光分子のゆらぎを捉えることに利用されてきた。非細胞系溶液とは、本発明のような蛍光標識された細胞内生体分子を発現している細胞内ではなく、蛍光標識された分子が懸濁された溶液系を意味する。このような非細胞系溶液の場合、FCS計測に先立って蛍光分子の分子数を調整することは比較的容易に行われてきた。FCS計測では、適切な計測が可能な試料の蛍光分子濃度に制限があり、その濃度範囲より低すぎても高すぎても適切な計測ができないため、上記のような蛍光分子数の調整は必要な操作である。

しかし、本発明のように蛍光蛋白質遺伝子との融合遺伝子

を作製し、その融合遺伝子を導入することにより得られる蛍光標識された細胞内生体分子は、細胞内における濃度、すなわち発現量を制御することは難しい。実際、細胞内に F C S 計測に最適な蛍光分子濃度を、遺伝子導入による蛍光分子発現細胞の作製のたびに再現することは多くの困難を伴う。よって、F C S 計測不可能な細胞を使用する手間を省くためだけでなく、生理的機能の解析において再現性のよいデータを得るためにには、F C S 計測に適した濃度で、蛍光標識生体分子を安定して発現するような細胞系を構築することは重要である。また、このようにF C S 計測に適した均一な細胞を利用して実験系を構築することは、評価システムを確立する上で大変重要なことである。

我々は上記課題を本発明において見出し、ホルモンレセプターと相互作用する物質を検査する上で、F C S 計測に適した均一な細胞系をつくることを検討した。その上で、この均一な細胞系を利用して、動物試験に代替できるような生体に近い評価システムを確立することを目指した。

よって、本発明の更に好ましい態様として、以下に記載の手段 A ~ D を採用する。F C S による検出に適した細胞クローンを選択する手段の概要は図 5 に示す。

#### A. 薬剤耐性細胞クローンの選択

ホルモンレセプターとマーカー物質との融合遺伝子の一過性の発現では安定な試験系とすることができないため、融合遺伝子に薬剤耐性遺伝子（グネティシン、ネオマイシン、カナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子）をもつよう遺伝子ベ

クターを設計し、細胞内生体分子の蛍光標識を定常的に発現する細胞のみを選択することを可能にする。

#### B. FCSによる計測に適した細胞の選択

本発明においてFCSによる検出に適した細胞とは、検出する光信号の強度がFCSにより測定可能であること、および該細胞内の標識されたホルモンレセプターがその生理機能を保持し、該細胞が生体に近い評価システムを構築していることを意味する。

#### B-1. 細胞の発生させる光信号の強度による適性細胞の選択

上述のように、ホルモンレセプター蛋白質を、光信号を発生し得る蛍光物質で標識して細胞内に存在させ、次いでその細胞のなかから、最適な光強度の信号を発する細胞を選択する。

FCS計測は、共焦点領域が $1\text{ fL}$ と微小であり、その領域に含まれる蛍光分子数が0.1~100個程度でないと適切に分子ゆらぎを計測できない。すなわち $10^{-7}\sim 10^{-9}\text{ M}$ が蛍光分子の濃度として最適であるため、細胞内で発現している蛍光分子量が最適な細胞を選別することが必要である。

即ち、蛍光標識したレセプター分子をFCSで計測するためには、細胞内において同分子が計測可能な分子濃度の範囲内で存在していなければならず、多すぎても少なすぎても計測できない。その様子を図6に示す。図6は上から順に、FCS計測に必要な蛍光分子濃度に対して蛍光分子数が少なすぎる場合、蛍光分子数が適切な中程度の場合、蛍光分子数が

多すぎる場合をそれぞれ示す。蛍光分子数が少なすぎる場合、および蛍光分子数が多すぎる場合の何れも対象分子の動きを表現する自己相関関数を適切に設定することができない。一方、蛍光分子数が適切な場合、図7に示すように対象分子の動きを表す自己相関関数を適切に設定することが可能となる。

従って、FCS計測に適切な光信号を発する細胞の選択のためには、蛍光を定性的かつ定量的に判定できればよい。以下に考えられる分析方法を示す。

(a) 蛍光顕微鏡は、細胞を培養状態で容易に観察できるため汎用できるが、蛍光強度の定量ができない。(b) フローサイトメトリーは、複数の細胞について、蛍光量が細胞ごとに測定でき、平均等についても定量できるため、クローン間の蛍光強度の比較ができる点で優れている。細胞は生きたまま計測できるが、細胞を浮遊させるための手間がかかる欠点を有する。(c) 蛍光プレートリーダも同様に、複数の細胞について、蛍光量の平均等について定量できるため、クローン間の蛍光強度の比較ができる点で優れている。また、蛍光プレートに細胞培養できれば、同時に多数の細胞クローンを計測することができる。

本発明においては、上記分析方法のうち、フローサイトメトリー(FCM)によりクローンごとの細胞あたりの蛍光強度を定量した。FCS計測の前に、細胞あたりの蛍光強度を定量的に判定しておき、これをFCS計測した蛍光解析の結果と照合することで、最適な蛍光分子数をもつ細胞を選別することが可能となる。本発明ではこのような方法から、FC

S 計測に最適なフローサイトメトリーの細胞あたりの蛍光強度は、陰性コントロール（遺伝子未移入細胞）を 0.1とした時、0.2～240、好ましくは 0.2～60 であることがわかった。なお、細胞ごとの蛍光を定量する手段としては、F C M に限らず、非フロー式のレーザースキャニングサイトメーター（L S C）その他のものでもよい。蛍光強度は、計測機や蛍光試薬の種類、測定条件、測定環境等に応じて適宜定義を設けるのが好ましく、例えば融合遺伝子が導入されていない領域（例えば細胞）の自家蛍光の測定値によって決定できる蛍光強度比で表現してもよい。蛍光強度比で表現した場合、F C S の適用に最適な細胞は 1～1200、好ましくは 1～300 の範囲で選択できる。

#### B - 2 . 蛍光標識ホルモンレセプターの生理機能確認による適性細胞の選択

上述の細胞内遺伝子移入により発現される分子が、その生理機能を保持していることを確認する必要がある。そのためには、多くの細胞クローンのなかから生理機能を保持している細胞クローンを適切な方法で確認し、選択することがよい。

本発明においてホルモンレセプターの生理機能とは、光信号を発生可能な蛋白質としての機能およびホルモンレセプターとしての機能の両方を意味する。

まず蛍光蛋白質としての機能は、蛍光顕微鏡により定性的に観察し、蛍光発現を確認することで確認できる。

ホルモンレセプターとしての機能は、ホルモンレセプターが生理的に核内に局在することが分かっているので、位相差

蛍光顕微鏡により核内に蛍光が局在していることを観察することで遺伝子内の核局在シグナルの保持を確認できる。また、ホルモン受容体に対する抗体を用いたイムノアッセイ（フローサイトメトリー や ウエスタンプローチティング解析）を行うことで確認できる。

#### C. F C S 計測に妨害となる物質の除去

本発明において、マーカー標識された蛋白質を発現する細胞の培養液に、pH指示薬（フェノールレッド）を含んでいると、pH指示薬（フェノールレッド）がホルモン作用をもち、同時に蛍光を発するため、F C S 計測にとって非特異的蛍光として計測を障害する。また、細胞培養液は、炭酸ガスによる生理的pH緩衝作用があるが、F C S 計測中、炭酸ガスを供給できないため培養液のpHがアルカリ性へシフトしてしまい生細胞には毒性がある。

上記問題点を解決するため、F C S 計測用細胞培養液としては、pH指示薬（フェノールレッド）を含まず、かつ中性緩衝作用のある安定な組成を採用することが好ましい。すなわちF C S 計測中は、従来の細胞培養状態であるCO<sub>2</sub>5%かつ37℃状態を再現できないため、炭酸ガスによらない緩衝作用をもつ培養液、例えばLeibovitz-15培地、10~20 mM HEPES等により生理的pHを制御できる培養液を使用することが好ましい。

#### D. 薬剤代謝活性を有する生体抽出物による被検物質の前処理

調べたい化学物質（以下、被検物質という）が実際にヒト

などの生体内に摂取された後、化学構造の修飾をうけずそのままの状態で生体に作用を及ぼす場合と、生体内の酵素系によって代謝されてできた代謝産物が作用を及ぼす場合の両方が考えられる。実際、ヒトでは内分泌攪乱作用を有する物質などを摂取すると一旦は肝臓に入るため、生体内の酵素系によってできた代謝産物が内分泌攪乱作用をもつ場合も充分想定される。よってその検出を生体外で再現できる方法を、以下説明する。

すなわち、被検物質を投与する直前、あるいは同時に、薬剤代謝活性をもつ生体抽出物（例えば肝臓 S 9 分画）と被検物質とを接触させて、代謝による被検物質の化学構造の修飾を行ってから、上述のとおり内分泌攪乱作用の検出を行う。この検出と並行して、薬剤代謝活性をもつ生体抽出物による処理なしに、被検物質をそのまま投与して内分泌攪乱作用を検出する試験を行ってもよい。

その結果、被検物質が化学構造の修飾をうけずそのままの状態で生体に作用を及ぼす場合と、生体内の酵素系によって代謝され、化学構造に代謝を受けた代謝産物が作用を及ぼす場合の両方を検討することが可能となる。従って、被検物質をそのまま投与して行う従来試験法では検出できなかった、被検物質の生体内における代謝産物の内分泌攪乱性の有無をも評価が可能となり、より精度高く、化学物質の内分泌攪乱性を評価することが可能となる。

#### 実施例

以下、本発明の実施例について記載する。

[ヒトエストロゲンレセプター $\beta$  (hER $\beta$ ) 遺伝子のクローニング]

ヒトER $\beta$ の塩基配列をもとに同遺伝子クローニングのために以下のプライマーを設計した。

プライマー1 : 5' -G T G C C T C T T C T T G C  
A A G G T G T T -3' (配列番号2)

プライマー2 : 5' -T C A G C T T G T G A C C T C  
T G T G G -3' (配列番号3)

このプライマーを用い、ヒト精巣cDNAライブラリー(Clontech)を鋳型として、PCRを以下のような条件で実施した。すなわち、ヒト精巣cDNAライブラリー約400ngを鋳型とし、上記プライマー各4 $\mu$ Mと、0.2mM dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mM)、40 mM Tricine-KOH、15 mM KOAc、3.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>、3.75 $\mu$ g/mL BSA、0.005% Tween-20、0.005% Nonidet-P40、ならびにAdvantage 2 Polymerase Mix (Clontech #8430-1) 5 $\mu$ Lを含む、50 $\mu$ LのPCR反応液を用いてPCRを実施した。PCR反応は、最初の変性(95°C, 4分)の後、95°C 1分、62°C 1分、72°C 2.5分の条件で7サイクル反応を行い、引き続き、95°C 1分、58°C 1分、72°C 2.5分の条件で25サイクル反応を行ったのち、最後に72°C 10分反応の後、反応物を4°Cで保存した。

PCR反応産物の一部(5 $\mu$ L)を1%アガロースゲルにて電気泳動し、産物の分子サイズが目的産物であるER $\beta$ とほぼ同じであることを確認した後、TAクローニングキット

(Clontech #K1901-1) を用いて PCR 産物のクローニングを行った。すなわち PCR 反応後 24 時間未満の PCR 産物 2  $\mu$ L を、 6 mM Tris-HCl、 6 mM MgCl<sub>2</sub>、 5 mM NaCl、 0.1 mg/mL BSA、 7 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、 0.1 mM ATP、 2 mM ジチオトレイトール、 1 mM スペルミジン、および 50 ng pT-Adv ベクター、ならびに 4.0 Weiss ユニットの T4 DNA リガーゼを含む 10  $\mu$ L 反応液中で、 14°C で 12 時間以上インキュベートした。

その後、そのライゲーション反応液 2  $\mu$ L を用い、キットプロトコールに従い、 TOP10F' E. coli (Clontech #K1901-1) を形質転換した。

得られた形質転換体より、 NucleoBond Plasmid Kit (Clontech #K3001-1) を用いてプラスミドを単離し、塩基配列解析に用いた。塩基配列解析は、 PE Biosystems 377XL 装置を用い、 Dye Terminator Cycle Sequencing 法により実施した。

塩基配列解析の結果、得られたクローンのインサート DNA 配列は、ヒトエストロゲンレセプター  $\beta$  遺伝子の 53-1735 bp の配列部分と同一であった。この配列は、ヒトエストロゲンレセプター  $\beta$  蛋白質のコード領域を開始コドンから終始コドンまで全て含んでいる。

#### [融合遺伝子の作製および発現プラスミドの構築]

上述のように単離した h E R  $\beta$  遺伝子を、 p E G F P - C 1 ベクター (GenBank Accession#:U55763) にサブクローニングすることにより、 h E R  $\beta$  遺伝子とオワンクラゲ由来の

緑色蛍光蛋白質 G F P (Green Fluorescent Protein) 遺伝子との融合遺伝子の作製、および哺乳類培養細胞発現用プラスミドの構築を行った。 p E G F P - C 1 ベクターの模式図を図 1 に示す。

上述のとおり作製された h E R  $\beta$  / pT - Adv プラスミド約 20  $\mu$ g を、 HindIII および BamHI の 2 種の制限酵素で切断後、全量を 1.0% の低融点アガロースゲルにて電気泳動した。ゲルをエチジウムプロマイドで染色後、 UV トランスイルミネーター上で切断 DNA フラグメントサイズを確認しながら、約 1.7 kb の E R  $\beta$  遺伝子フラグメント由来のバンド部分を切り出した。この切り出しゲルから、 Concert Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL 11456-019) を用い、 E R  $\beta$  フラグメントを精製した。

同様に、 p E G F P - C 1 ベクター約 20  $\mu$ g を、 HindIII および BamHI の 2 種の制限酵素で切断し直鎖状にした後、全量を 1.0% の低融点アガロースゲルにて電気泳動して約 4.7 kb の直鎖状 p E G F P - C 1 フラグメントのバンド部分を切り出し、この切り出しゲルから、 Concert Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL 11456-019) を用い、 p E G F P - C 1 ベクターを精製した。

このベクターフラグメント 0.03 pmol、および上述のとおり精製した h E R  $\beta$  フラグメント 0.1 pmol を含む DNA 溶液約 10  $\mu$ L を、等量の TAKARA DNA Ligation System Ver. 2 の I 液 (TAKARA #6022) と混合して 16°C で約 12 時間インキュベートし、ライゲーションを行った。

この反応液 10 μL を用い、大腸菌 DH 5 α (TAKARA #9057) を形質転換 (トランスフォーメーション) し、得られた形質転換体より、NucleoBond Plasmid Kit (Clontech #K3001-1) を用いてプラスミドを単離し塩基配列解析に用いた。塩基配列解析は、PE Biosystems 377XL 装置を用い、Dye Terminator Cycle Sequencing 法により実施した。

融合遺伝子の塩基配列の一部を図 9 に示す。図 9 は、5' から 3' 方向に順に、緑色蛍光蛋白質の遺伝子 (図中、EGFP) 、マルチクローニングサイトを挟んで hERβ 遺伝子 (図中、hERβ) が配置されていることを示す。図中、下線部の配列 (GT GCC TCT TCT TGC AAG GTG TT) は、hERβ 遺伝子クローニングに使用したプライマー配列部分を示し、波下線部の配列 (AA GCT T) は、HindIII 制限酵素サイトを示す。ボックスで囲んだ ATG 部位は、hERβ 遺伝子の転写開始コドンを示す。

#### [発現プラスミドによるヒト培養細胞株の形質転換 (トランスフェクション) ]

上述のように構築した融合遺伝子発現プラスミド GERb3-9-1 を用いて、ヒト乳がん組織由来培養細胞株である MDA-MB-231 培養細胞株の形質転換 (トランスフェクション) を行った。ヒト乳がん組織由来培養細胞株 MDA-MB-231 は ATCC から購入し、10% FBS (ウシ胎児血清) を添加した L-15 培地にて、37°C の加湿培養器内で培養した。トランスフェクションする前日に MDA-MB-231 をトリプシン処理して分散させ、60 mm シャーレに約  $2 \times 10^5$  個播種し、翌日 GERb3-9-1

プラスミドをリポフェクチン (GIBCO #10964-013) により導入した。

GERb3-9-1 プラスミド 2  $\mu$ g を含む DNA 溶液を、250  $\mu$ L の血清を含まない L-15 培地に希釈し、これにプラス試薬 8  $\mu$ L を添加して室温で 15 分放置した。その後、この DNA - プラス試薬混合溶液に、リポフェクトアミン試薬 12  $\mu$ L を血清を含まない L-15 培地 250  $\mu$ L で希釈したもの添加し、さらに室温で 15 分放置した。この間に前日細胞を播種しておいたシャーレから培養液を除き、血清を含まない L-15 培地 2 mL と交換した。15 分後、作製しておいた DNA - プラス試薬 - リポフェクトアミン混合溶液 2.5 mL を、無血清 L-15 培地 2 mL で培養液を置換した培養シャーレに添加し、3 時間 37°C の加湿培養器内でインキュベートした。3 時間後、培養液を通常の 10% FBS 含 L-15 培地 5 mL で置換し、さらに 24 時間以上培養し、GERb3-9-1 プラスミドによる MDA-MB-231 培養細胞株のトランスフェクションを行った。

[安定した形質転換培養細胞系の構築と同細胞系における融合蛋白質の発現]

上述のとおりトランスフェクションを行った培養細胞をトリプシン処理して分散し、新しいシャーレに希釈して再播種し、1 日後、G418 を最終濃度 600  $\mu$ g/mL になるよう添加した。その後、3 ~ 4 日ごとに培養液（選択培養液、10% FBS および 600  $\mu$ g/mL G418 を含む L-15 培地）を交換しながら培養を継続し、G418 による安定型トランスフェクタントの選択を行った。約 2 週間後、安定して G418 耐性を獲得した細

胞クローンを単離し、GERb3-9-1 プラスミドによる安定した形質転換培養細胞系を樹立した。ここで、エストロゲンレセプターとGFPの融合蛋白質を安定して発現する細胞クローンを得るのは困難であった。なぜなら、同融合蛋白質を比較的高レベルで発現するような細胞は、トランスフェクション後数日のうちに死滅してしまう現象がみられたからである。本発明では複数回トランスフェクションを行い、大量な細胞をスクリーニングすることにより安定して同融合蛋白質を発現する細胞系（クローン）を得た。

樹立した形質転換培養細胞系の蛍光顕微鏡による写真を図2に示す。GERb3-9-1 プラスミドによりコードされるGFP/hER $\beta$ 融合蛋白質が、細胞内で発現し、細胞核内に局在しているのが観察された。

[細胞内エストロゲンレセプター分子の蛍光抗体による標識]

#### 細胞播種

1. 対数増殖期のヒト乳癌培養細胞 MCF-7 を、トリプシン + EDTA (0.25% trypsin-EDTA : GIBCO CAT#25200-056) で剥がし、D-PBS (リン酸緩衝液) で2回洗浄 (遠心 300×g、5分) する。

2. D-PBS 50 $\mu$ L を希釈液として、約 5 × 10<sup>5</sup> 個の細胞になるように抗体ごとの各試験管に分注する (合計 10 本)。

#### 細胞低張処理

細胞低張液として、IMMUNOTECH (コールター) 、CAT#2388、IntraPrep Permeabilization Reagent、50test 分を使用す

る。

3. IntraPrep Reagent 1 を  $100 \mu\text{L}$  添加し、ボルテックスにかけて良く混和する。

4. 室温（18～25°C）で 15 分間インキュベーションする。

5. D-PBS を 4 mL 加え、室温で遠心分離（ $300 \times g$ 、5 分）し、上清を吸引除去する。

6. 細胞をタッピングしてほぐし、IntraPrep Reagent 2 を  $100 \mu\text{L}$  添加し、ボルテックスは使わずに静かに混和する。

7. 室温で 15 分間インキュベーションする。

8. 指で静かに 1, 2 秒タッピングする（ボルテックス不可）。

#### 一次抗体添加

抗 ER  $\alpha$  抗体として、Affinity Bioreagents. inc, CAT#MA1-310、抗エストロゲンレセプター抗体モノクローナル（マウス）を使用し、抗 ER  $\beta$  抗体として、Affinity Bioreagents. inc, CAT#PA1.1-313、抗エストロゲンレセプター抗体ポリクローナル（ウサギ）を使用する。

9. 抗 ER  $\alpha$  抗体もしくは抗 ER  $\beta$  抗体を希釈液 D-PBS で 200 倍希釈し、所定の試験管に  $50 \mu\text{L}$  加え、静かに混和する。

10. 室温、暗所で 15 分間インキュベーションする。

11. D-PBS を 4 mL 加え、室温で遠心分離（ $300 \times g$ 、5 分）し、上清を吸引除去する。同様の洗浄を合計 2 回行う。

#### 二次抗体添加

蛍光標識抗マウス抗体として、Molecular Probes, CAT#A-11029、アレクサ 488/goat anti-mouse IgG(H+L)、0.5 mL を

使用し、蛍光標識抗ウサギ抗体として、Molecular Probes, CAT#A-11037、アレクサ 594/goat anti-rabbit IgG、0.5 mL を使用する。

12. 蛍光標識抗マウス抗体（アレクサ 488）もしくは蛍光標識抗ウサギ抗体（アレクサ 594）を、それぞれ希釈液 D-PBS で 100 倍、200 倍希釈し、これを所定の試験管に 50 μL 加え、静かに混和する。

13. D-PBS により洗浄操作を 3 回行う。

14. 0.5% ホルムアルデヒドを添加した D-PBS 500 μL に浮遊させ、フローサイトメーターで解析する。

上記方法により、細胞内エストロゲンレセプターは蛍光標識される。ヒト乳癌細胞 MCF-7 が、エストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ ) を発現していることが、フローサイトメトリーで解析された。その解析結果を図 10 に示す。ヒト乳癌細胞 MCF-7 は、エストロゲンレセプター $\beta$  (ER $\beta$ ) を発現していなかった。一方、ヒト乳がん組織由来細胞 MDA-MB-231 では、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ともに発現していなかった。

[蛍光蛋白質の遺伝子のみを導入した細胞の蛍光強度と FCS 計測の比較]

MCF-7 細胞を約 80% コンフルエントに播いた 60 mm シャーレあたり、蛍光蛋白質をコードする遺伝子を含む発現ベクター pEGFP-c1、pEYFP-c1、pECFP-c1、それぞれ 1 ~ 10 μg を用いて CLONfection (CLONTECH 社) によるリポフェクション法によりトランスフェクションした。MCF-7 細胞の増殖培地 (MEM + 10% ウシ胎児血清 + 非必須アミノ酸 + 1 mM

ピルビン酸ナトリウム)に 600~800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  geneticin を添加して選択培地とし、3~4日おきに培地交換しながら  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 2~3 週間培養し、選択されたクローンを得た。

細胞クローンを最適な蛍光フィルターを用いて蛍光顕微鏡により観察した。蛍光蛋白質 GFP および YFP を発現している細胞は、その蛍光を観察できたが、CFPについては主な蛍光シグナルを捉えることができなかった。

また、得られた細胞クローンは、フローサイトメトリー (BECKMAN-COULTER 社、XL) により、フィルタ P F 1、P F 2 を用いて蛍光強度の比較をした。

フローサイトメトリーの解析方法を以下、説明する。

1. 蛍光蛋白質遺伝子のみを導入した MCF-7 細胞クローンをそれぞれ培養し、細胞数約  $10^6$  個をトリプシン + EDTA で剥がし、D-PBS で 2 回洗浄する。

2. 専用管へ入れ、フローサイトメトリーへかける。

3. 細胞クローンを使用して、細胞の大きさおよび密度のゲーティングを行う。

4. 得られた細胞集団の蛍光強度が最適になるように蛍光補正を必要に応じてかける。

蛍光強度を測定した結果を図 1 1 ~ 図 1 3 に示す。

このうち、蛍光強度の違いのある細胞クローン GFP-5、YFP-3において、FCS 計測のデータを比較した。FCS 計測は ZEISS の FCS (ConfoCor<sup>®</sup>) を用いて行った (光源 Ar レーザー、対物レンズ 40 倍、共焦点領域 ;  $0.25 \mu$

$\text{m}$ (半径)  $\times 1.7 \mu \text{m}$ (高さ))。GFP-5は蛍光強度が高く(平均蛍光強度 353.5 MnX)、適正な蛍光分子濃度を超えていた。YFP-3(平均蛍光強度 170.5 MnX)は適正な蛍光分子濃度を有しているためFCS計測可能であり、その自己相関関数は図7に示されている。蛍光を発しないクローン細胞は、自己相関関数を適切に設定することができなかった。

蛍光強度の高いGFP-5は、計測領域内の分子数が限界値の100を越えたことにより、FCSでは計測できないことがわかった。別途、溶液中のローダミン123を0.1~1000 nmol/LにしてFCS計測した結果と比較すると、GFP-5の蛍光分子の濃度は、約700 nM以上であると想定される。このことより、FCS計測のためには細胞内蛍光標識分子の濃度を0.1~700 nmol/Lとし、この値からフローサイトメトリーにおける細胞あたりの蛍光強度としては、陰性コントロール(遺伝子未移入細胞)を0.1とした時、0.2~240、好ましくは0.2~60がFCS計測に最適であると分かった。よって、この蛍光強度を有する細胞クローンをFCS計測のために選択すればよい。なお、細胞ごとの蛍光を定量する手段としては、FCMに限らず、非フロー式のレーザースキャニングサイトメーター(LSC)その他のものでもよい。蛍光強度は、計測機や蛍光試薬の種類、測定条件、測定環境等に応じて適宜定義を設けるのが好ましく、例えば融合遺伝子が導入されていない領域(例えば細胞)の自家蛍光の測定値によって決定できる蛍光強度比で表現してもよい。蛍光強度比で表現した場合、FCSの適用に最適な細胞は1~1200、好

ましくは 1 ~ 300 の範囲で選択できる。

このようにフローサイトメトリーを用いることにより、蛍光強度を定量化することができた。従って、各細胞クローンの蛍光強度を数値化する事が可能なため、FCS 解析における蛍光分子密度の最適な細胞クローンを選択する手法が確立された。

#### [リガンド結合にともなう融合蛋白質 2 量体化の検出]

樹立した GFP / h ER $\beta$  融合遺伝子発現培養細胞クローン # 1 を用いて、17 $\beta$  エストラジオール結合にともなう GFP / h ER $\beta$  融合蛋白質の 2 量体化の検出を行った。GFP / h ER $\beta$  融合遺伝子発現培養細胞クローン # 1 を 8 ウェルのラブテックチャンバー (Nunc #136439) に播種し、1 晩 37°C の加湿培養器内で培養した。その後、培養液を除き、細胞を PBS で洗浄した後、血清およびフェノールレッド不含 L-15 培地で培養液を置換した。これに 17 $\beta$  エストラジオールを最終濃度 10<sup>-7</sup>M となるよう添加し、以降経時的に 2 時間にわたり、細胞核内の GFP / h ER $\beta$  融合蛋白質の分子の動きを ZEISS の FCS (ConfoCor<sup>®</sup>) により計測した。

17 $\beta$  エストラジオール添加後、0 分および 45 分経過時の FCS 計測データを図 14 に示す。計測の結果、17 $\beta$  エストラジオール添加後、45 分で GFP / h ER $\beta$  融合蛋白分子の拡散時間の増加がみられた。このことは、17 $\beta$  エストラジオール結合にともなう GFP / h ER $\beta$  融合蛋白質の 2 量体化にともなう現象と判断された。同様の反応は、GFP のみを発現しているコントロール細胞においては観察されなかった。

このように、本発明により初めてエストロゲンレセプター分子の2量体化の段階を検出することが可能となった。

#### 発明の効果

以上説明したように本発明により初めて、蛍光ノレセプター融合蛋白質を細胞内で発現させた細胞を用いることにより、ホルモンレセプターと相互作用する物質を検査するための新たなアッセイ系を確立した。

本発明のアッセイ系を構築するために、ホルモンレセプター蛋白質の遺伝子と光信号を発生し得るマーカー物質の遺伝子とを融合した新規融合遺伝子を作製し、この融合遺伝子を含有する組換えベクターを構築した。次いで、前記組換えベクターを含む形質転換細胞を創製した。これにより前記形質転換細胞において、ホルモンレセプター/マーカー物質の融合蛋白質を発現させることができとなり、生きた状態の細胞内において、光信号を発生可能なホルモンレセプター蛋白質を発現させることができとなった。

この光信号を発生可能なホルモンレセプター蛋白質を発現している細胞に被検物質を投与すれば、その後のホルモンレセプター分子の動き（即ちシグナル伝達）を光信号で追跡することが可能となり、該被検物質の内分泌擾乱性を、生きた状態の細胞において評価することが可能である。

このように、ホルモンレセプター/蛍光蛋白質の融合体を細胞内に構築した場合、生理的機能を保持したまま、ホルモンレセプターと被検物質との結合を直接解析することが可能である。また、生きた細胞内でのホルモンレセプターの経時

的な動きを捉えることができるため、生体に近い評価システムである点で優れている。

その他、融合蛋白質を発現している細胞を使用する利点としては、一細胞でも計測可能であり少量の細胞しか必要としないこと、更に目的の蛋白質の外界刺激による細胞内局在の変化も観察可能であることが挙げられる。

一方で、精製した融合蛋白質に被検物質を投与することによっても該被検物質の内分泌攪乱性を評価することが可能である。

精製された融合蛋白質を使用する利点としては、細胞内に含まれるような余分な夾雑物を除いた検出系を組み立てることが可能でありノイズの少ない計測ができること、精製した融合蛋白質は、冷凍による長期保存も可能であり、細胞を継代維持する手間がかからないこと、更に目的の蛋白質濃度および反応温度等のコントロールもしやすく、実験条件を最適化しやすいことが挙げられる。

また、本発明を為すにあたり、ホルモンレセプター/蛍光蛋白質の融合遺伝子を生きた細胞に導入し発現させることにより生体を模倣した系を確立したため、F C S 計測に適した発現量をもつ細胞を選択する必要性が生じた。よって蛍光蛋白質の発現量をフローサイトメトリーにより定量化し、F C S 計測に適切な発現量をもつ細胞の蛍光強度の数値化を図った。こうして簡便な細胞の選択法が確立され、これにより、蛍光レセプター分子の生細胞内での動きを再現性よく高感度に検出できる安定な実験系の確立に至った。そして、安定な

実験系の確立により、従来不可能であった生細胞におけるホルモンレセプターの2量体化の検出までもが可能となった。

更に本発明のアッセイ系は、以下に記載の種々の効果を奏する。

本方法によれば、化学物質により誘発される蛍光／レセプター融合蛋白質を介した細胞内シグナル伝達の早期の段階（図3に示す段階I）から検出可能であるため、該化学物質の内分泌攪乱性を、従来法より早く数時間以内に検出可能である。

また、本方法によれば、ある化学物質が、レセプター蛋白質を介した細胞内シグナル伝達（即ち、図3に示す段階I～III）のどの段階までのシグナル伝達を誘発するかをみるとにより、その物質がアゴニストかアンタゴニストかが評価できるようになる。

また、遺伝子工学の手法を用いてGFP等の蛍光蛋白質とレセプター蛋白質の融合遺伝子を作製し、この結果できる蛍光融合蛋白分子の運動を検出指標としているため、従来法のように特別な試薬を加えることなく、細胞内シグナル伝達の各段階が検出可能である。

さらに細胞内シグナル伝達の各段階は、基本的に1個の細胞において検出可能であるため、従来技術のように多数の細胞を必要としない。また、細胞内シグナル伝達の検出にFCS等を用いることにより、蛍光／レセプター融合蛋白質1分子の運動の変化をも検出可能になることから、微量の化学物質についても高感度に内分泌攪乱性が検出可能となる。

このように F C S 計測による本方法は、サンプルが微量でよいため、High Through Put ; HTP 法による高速、微量計測の装置に適用しやすい利点を奏する。

更に本方法を用いてエストロゲンレセプターと結合できる物質を検出することにより、内分泌攪乱物質以外にも、生体内に自然に存在する女性ホルモンの検出（血中、尿中）にも適応できる。本方法は、性周期による変動や、排卵期におけるエストロゲンの高値、妊娠診断にも適応できる感度を有する。

#### 産業上の利用可能性

以上説明したように本発明は、ホルモンレセプターと相互作用する物質、例えば内分泌攪乱化学物質を検査する際に有効である。

## 請　求　の　範　囲

(1) ホルモンレセプターと相互作用する物質の検査方法であつて、

(a) 光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質と被検物質とを、該レセプター蛋白質が本来のリガンドと結合することができ、且つ本来のリガンドと結合したときにその状態が変化して、前記マーカー物質から放出される光信号の検出特性を変化させるような所定の条件下に維持する工程と、

(b) 前記所定条件下で前記マーカー物質から放出される光信号を検出する工程と、

(c) 前記工程 (b) で検出された光信号の検出特性と、前記被検物質の非存在下での前記マーカー物質から検出される光信号の検出特性とを比較し、その検出特性の変化に基づいて前記被検物質が前記ホルモンレセプター蛋白質と相互作用する物質であるか否かを判定する工程とを具備することを特徴とする検査方法。

(2) 前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質が、ホルモンレセプター蛋白質と光信号を発生し得るマーカー物質との融合蛋白質であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

(3) 前記光検出特性の変化が、前記ホルモンレセプター蛋白質／被検物質の複合体の 2 量体化に基づく変化であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

(4) 前記光検出特性の変化が、前記ホルモンレセプタ

一蛋白質／被検物質の複合体と、該複合体に対応する塩基配列との結合に基づく変化であることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

(5) 前記光検出特性の変化が、前記ホルモンレセプター蛋白質／被検物質の複合体と、前記複合体に対応する塩基配列との結合に伴って起こる、光発生性蛋白質遺伝子（レポーター遺伝子）の転写の有無に基づく発光の有無であることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

(6) 前記光検出特性の変化が、前記光信号の波長の変化であることを特徴とする請求項3記載の方法。

(7) 前記光検出特性の変化が、前記光信号の細胞内分布の変化であることを特徴とする請求項4記載の方法。

(8) 前記光検出特性の変化を、FCSによって検出することを特徴とする請求項1～5、7の何れか1項記載の方法。

(9) 前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質が、細胞内に発現した状態で、該発現細胞に被検物質を接触させる工程を有することを特徴とする請求項1または2記載の方法。

(10) 検出工程が、細胞中のマーカー物質から放出される光信号を検出する工程を有することを特徴とする請求項9記載の方法。

(11) 検出工程が、細胞の内側領域に合焦点を位置させることによって光信号を検出することを特徴とする請求項10記載の方法。

(12) 前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質が、該蛋白質を発現した細胞から抽出し浮遊させた液体の状態で、前記被検物質と混合反応させる工程を有することを特徴とする請求項1または2記載の方法。

(13) 請求項9記載の方法であって、前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質を発現している細胞のなかから、FCSによる検出に適した細胞を選択する工程を更に含むことを特徴とする方法。

(14) 請求項13記載の方法であって、前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質を発現している細胞のなかから、前記蛍光物質の発生する光信号の強度に基づいてFCS計測可能な細胞を選択する工程を含むことを特徴とする方法。

(15) 請求項13記載の方法であって、前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質を発現している細胞のなかから、細胞あたりの光信号の強度が、陰性コントロール(光信号未移入細胞)を0.1とした時、0.2~240の範囲にある細胞を選択する工程を含むことを特徴とする方法。

(16) 請求項13ないし15の何れか1項記載の方法であって、前記光信号を発生し得るマーカー物質で標識されたホルモンレセプター蛋白質を発現している細胞のなかから、前記標識されたホルモンレセプターが、その生理機能を有している細胞を選択する工程を含むことを特徴とする方法。

(17) 請求項13ないし16の何れか1項記載の方法であって、FCS計測の妨害となる細胞培養液中の物質を除去されたものであることを特徴とする方法。

(18) 前記被検物質を、薬剤代謝活性を有する生体抽出物と接触させる工程を具備する請求項1ないし17の何れか1項記載の方法。

(19) 前記ホルモンレセプター蛋白質が、エストロゲンレセプター蛋白質である請求項1ないし18の何れか1項記載の方法。

(20) 前記ホルモンレセプター蛋白質が、ヒトエストロゲンレセプター $\beta$ である請求項1ないし19の何れか1項記載の方法。

(21) 前記マーカー物質が、蛍光蛋白質である請求項1ないし20の何れか1項記載の方法。

(22) ホルモンレセプター蛋白質をコードする遺伝子と光信号を発生し得るマーカー物質をコードする遺伝子とが融合された融合遺伝子。

(23) エストロゲンレセプター蛋白質をコードする遺伝子と光信号を発生し得るマーカー物質をコードする遺伝子とが融合された融合遺伝子。

(24) 前記光信号を発生し得るマーカー物質をコードする遺伝子が、蛍光蛋白質をコードする遺伝子である請求項22または23記載の融合遺伝子。

(25) 配列番号1に記載されている塩基配列の99～1688位を少なくとも含むヒトエストロゲンレセプター $\beta$ 遺

伝子と緑色蛍光蛋白質をコードする遺伝子とが融合された融合遺伝子。

(26) 配列番号1に記載されている塩基配列の53～1735位を有するヒトエストロゲンレセプター $\beta$ 遺伝子と緑色蛍光蛋白質をコードする遺伝子とが融合された融合遺伝子。

(27) 以下の(a)または(b)の融合蛋白質。

(a) 請求項22ないし26の何れか1項記載の融合遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を有する融合蛋白質。

(b) アミノ酸配列(a)において一もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ光信号を発生し得、ホルモンレセプターの機能も保持する融合蛋白質。

(28) 請求項22ないし26の何れか1項記載の融合遺伝子を含有する組換えベクター。

(29) 請求項28記載の組換えベクターを含む形質転換細胞。

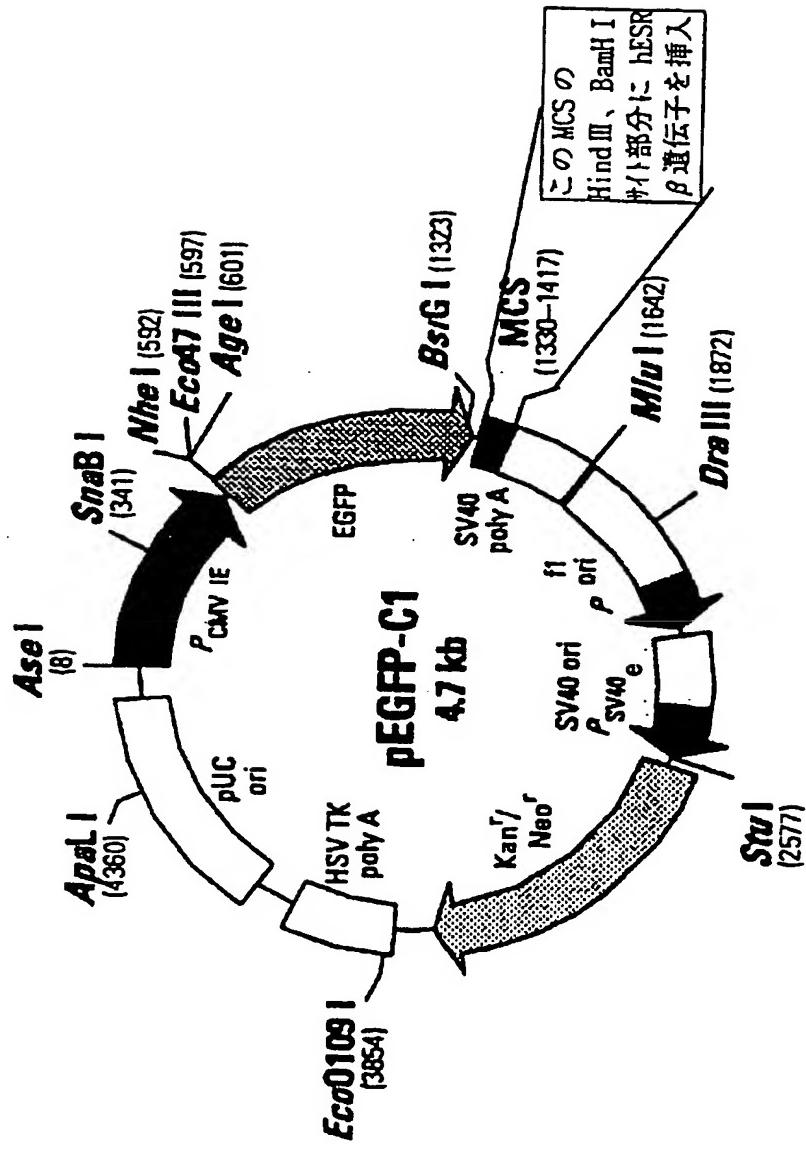


FIG. 1

2/14



FIG. 2

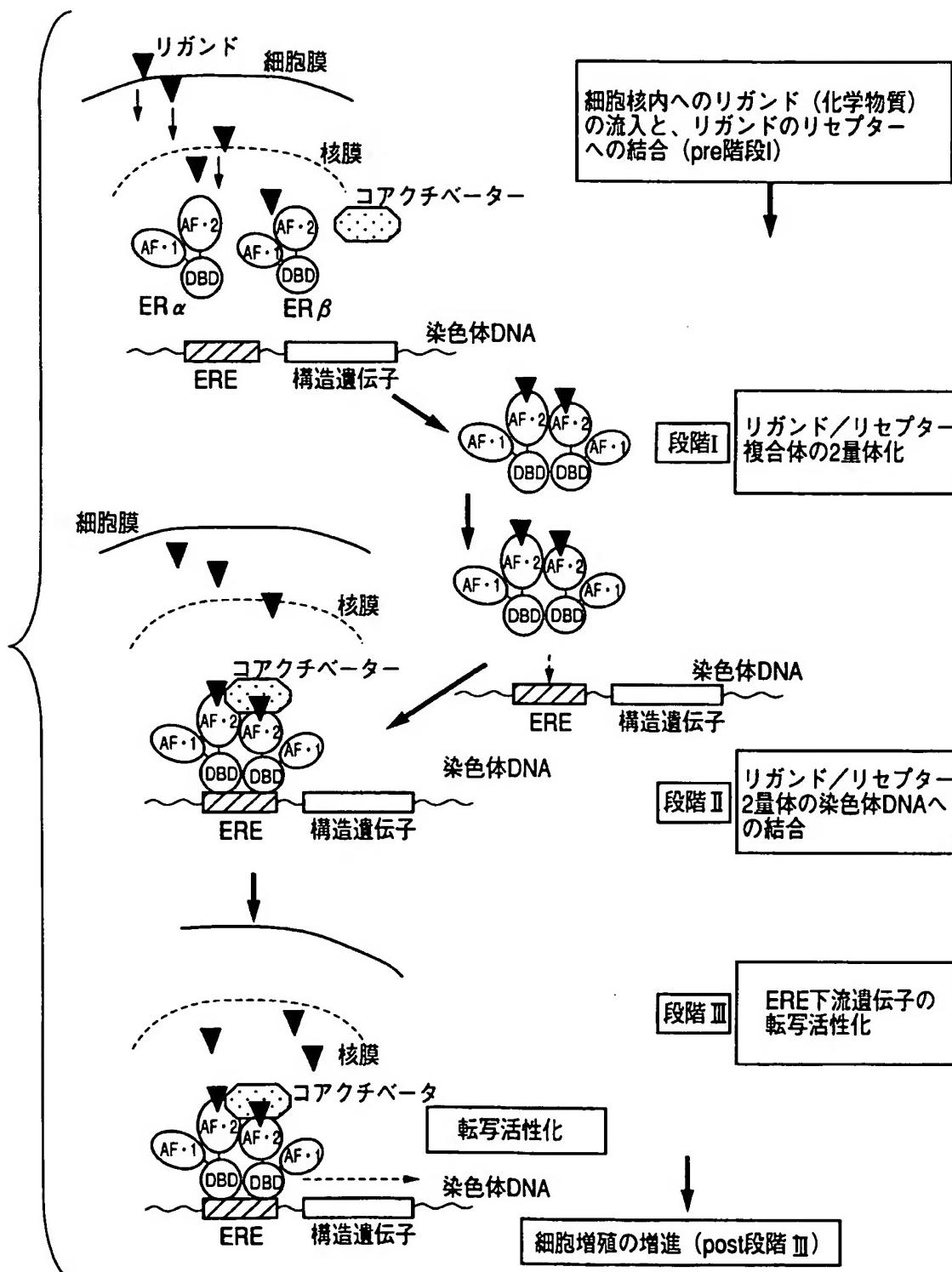


FIG. 3

4/14

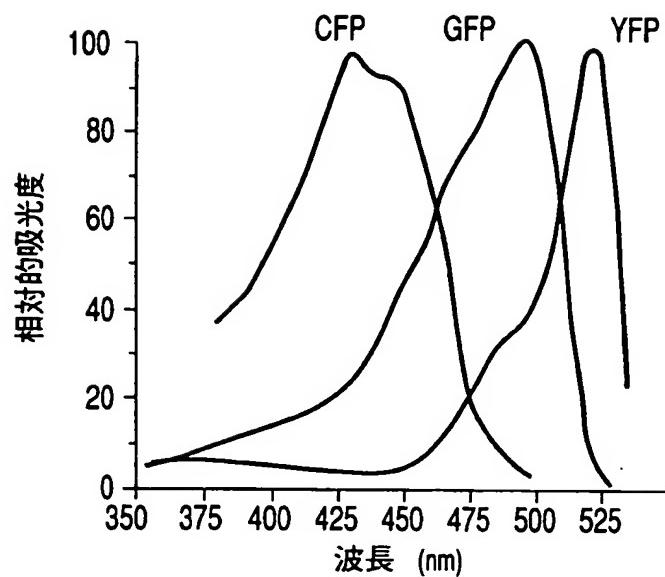


FIG. 4A

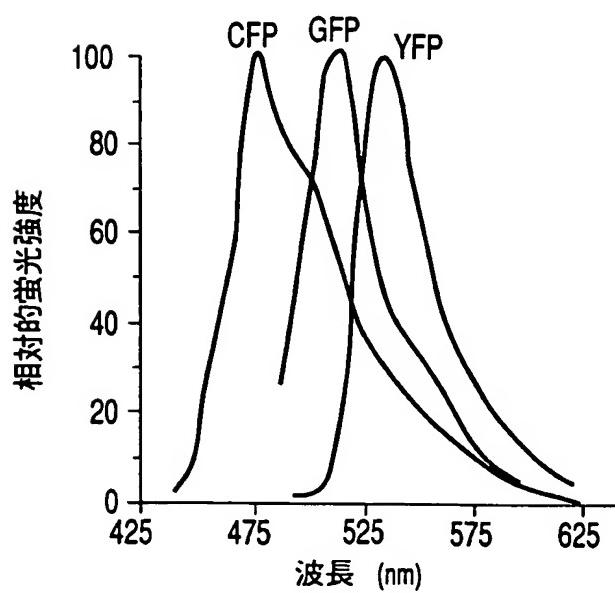


FIG. 4B

5/14

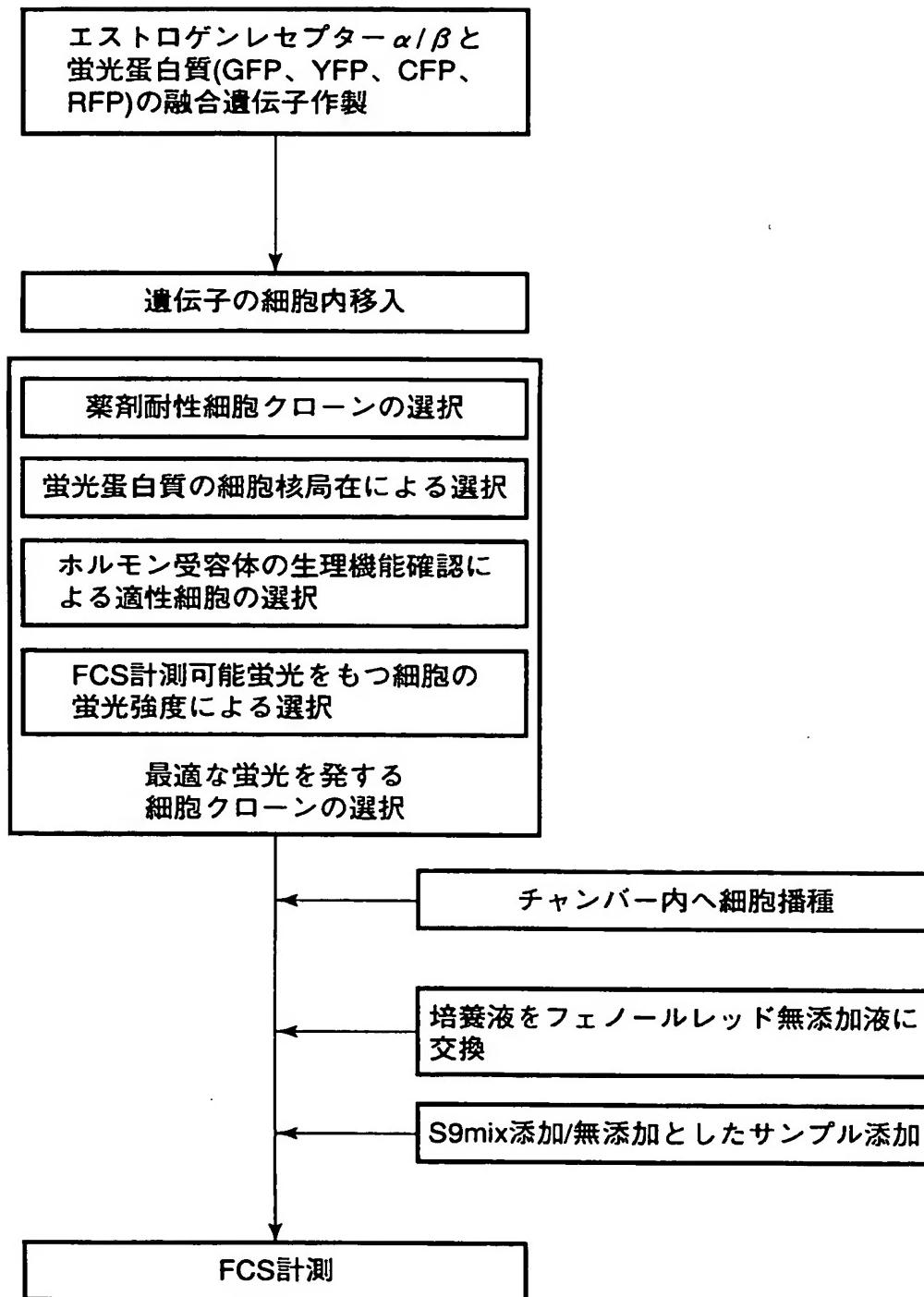
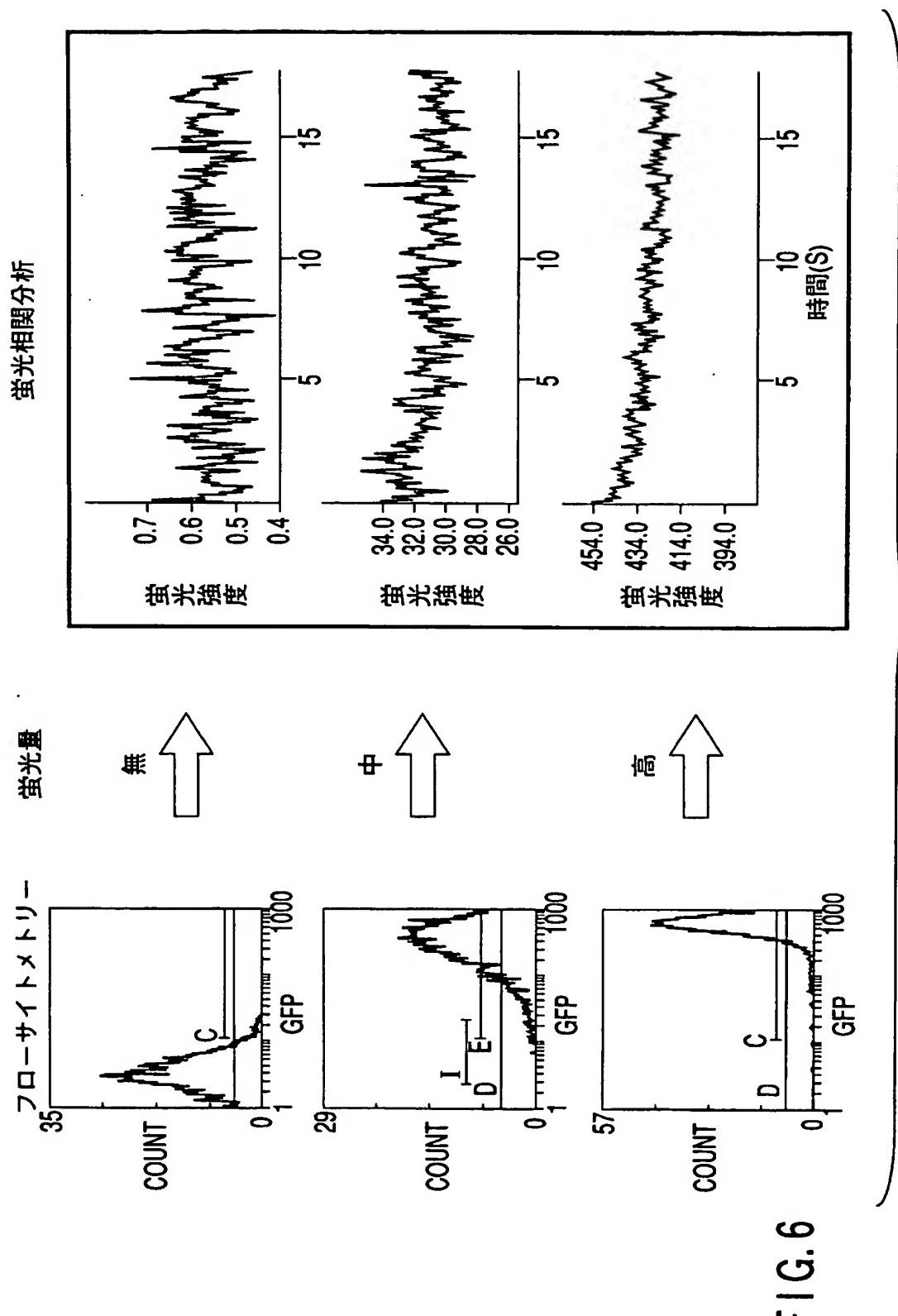


FIG.5

6/14



7/14

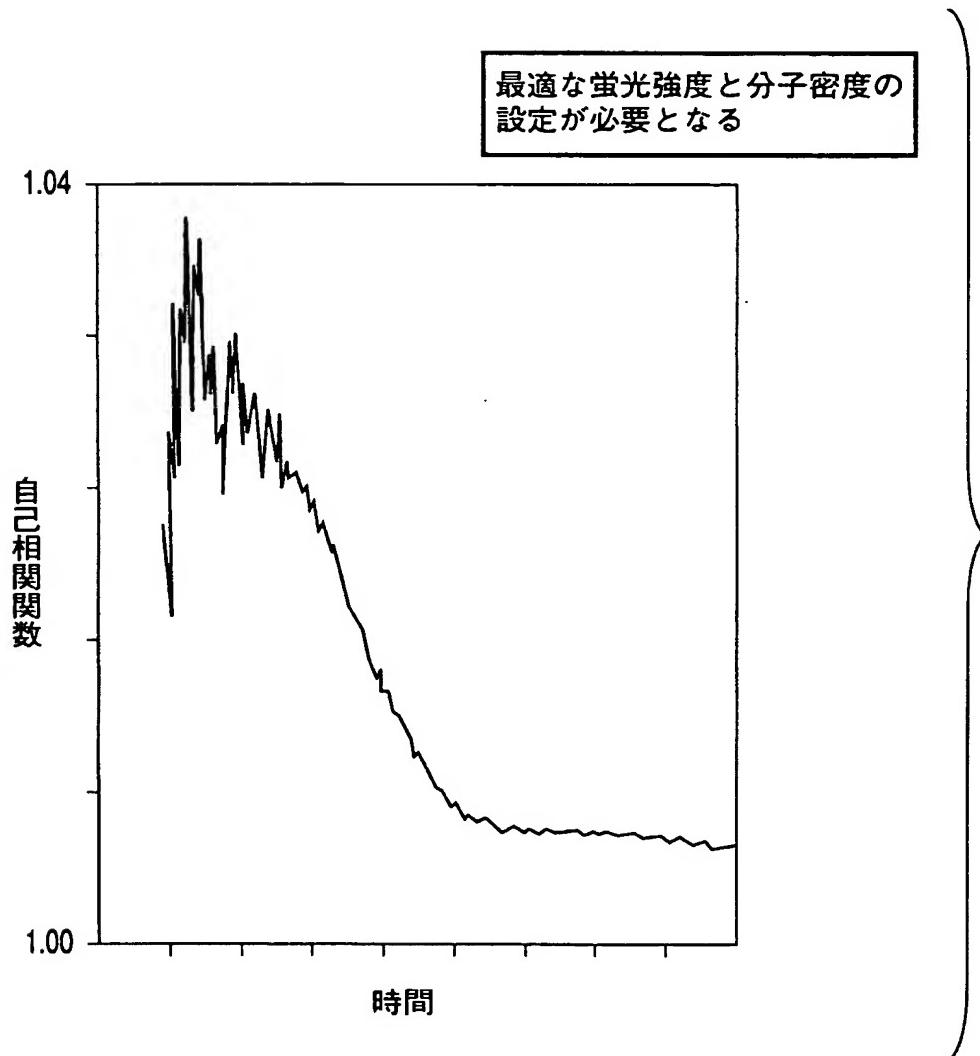


FIG. 7

8/14

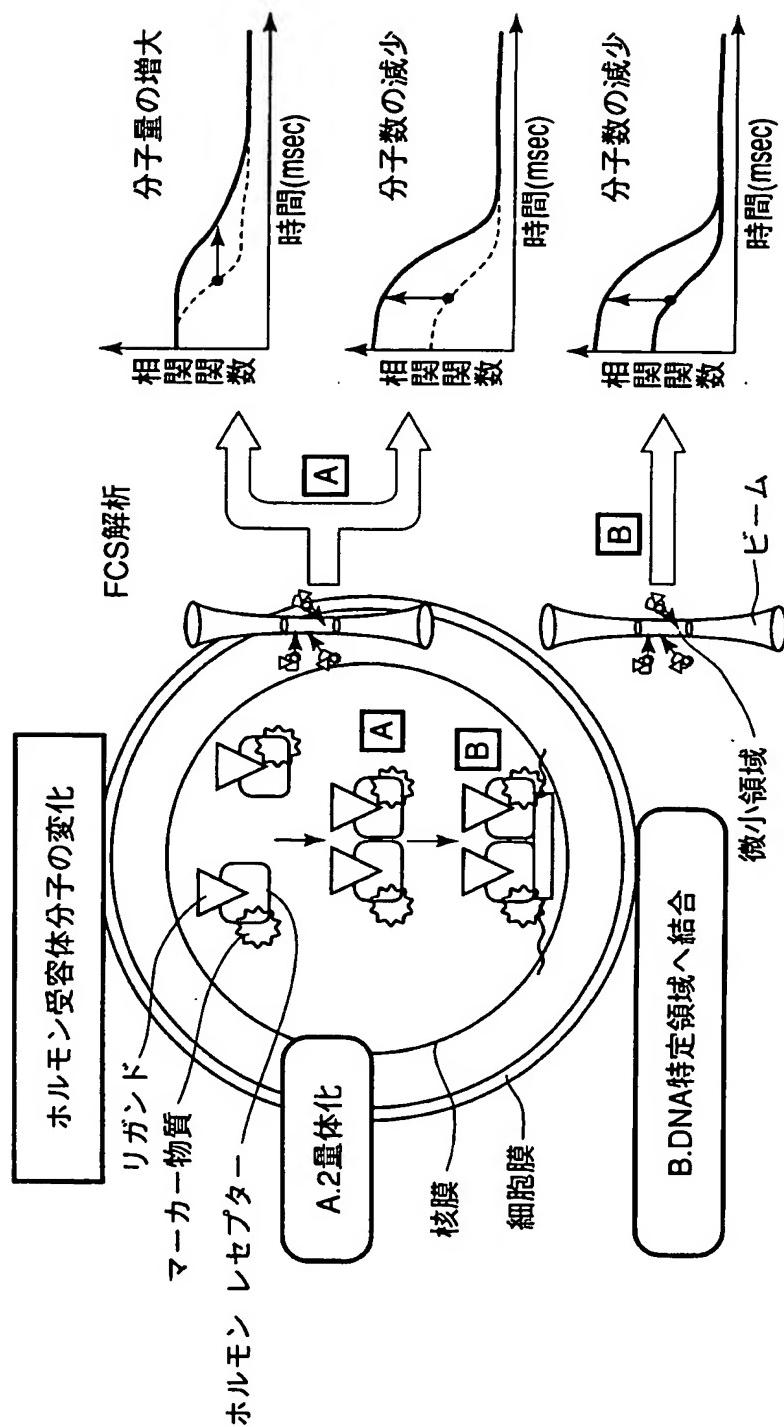


FIG. 8

9/14

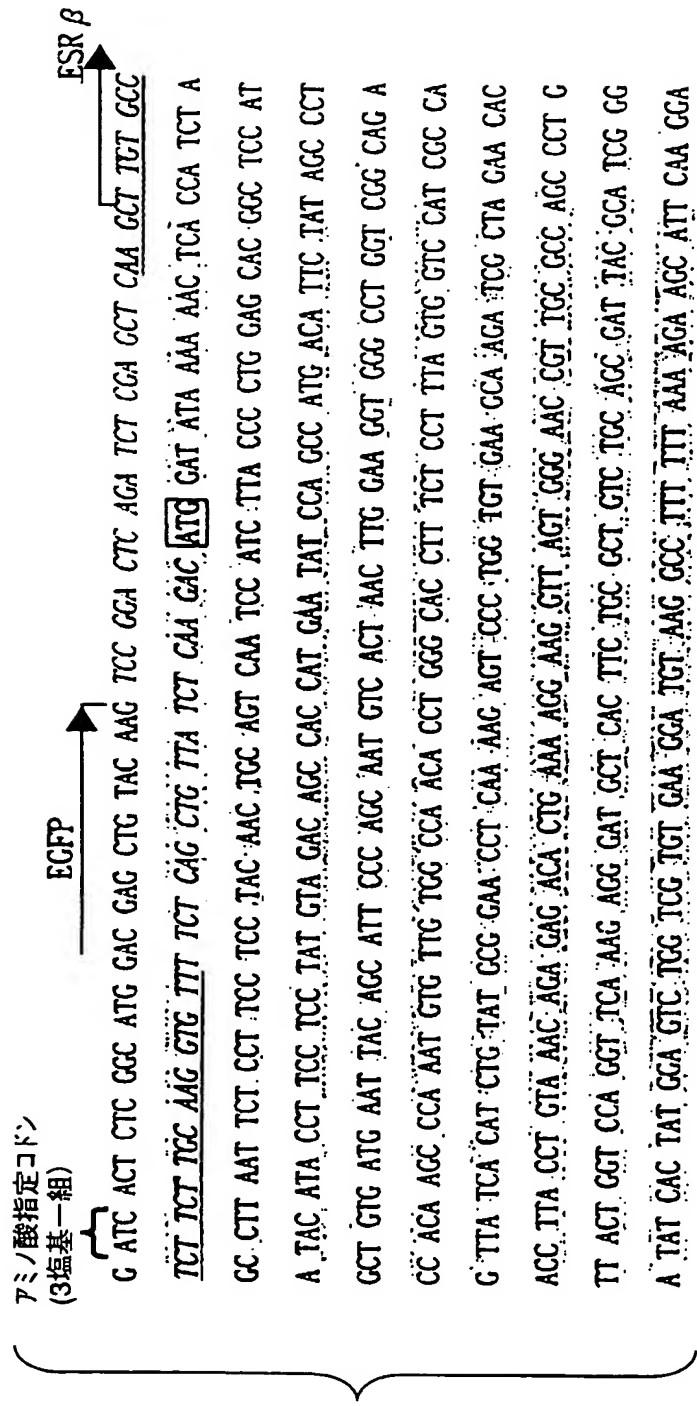


FIG. 9

10/14

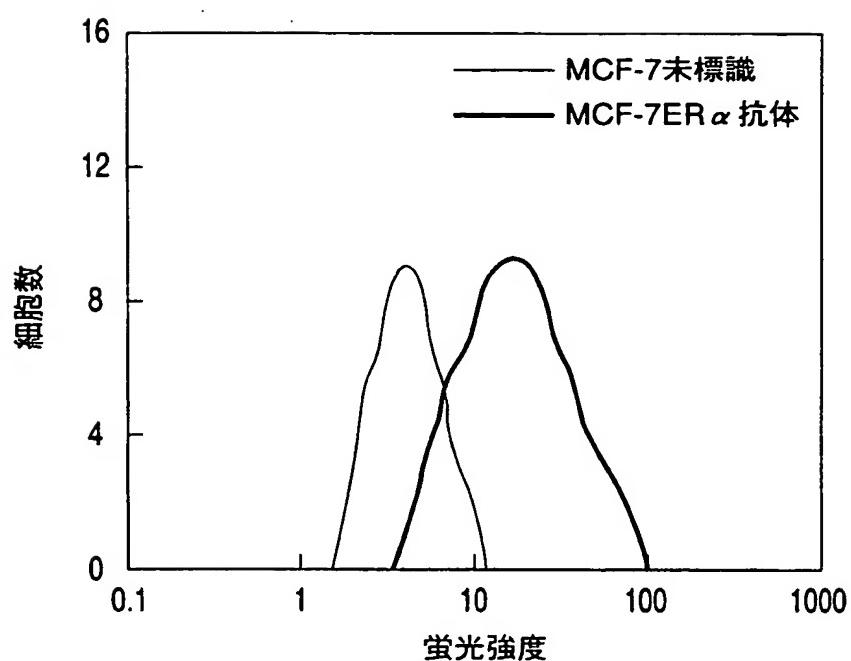


FIG. 10

11/14

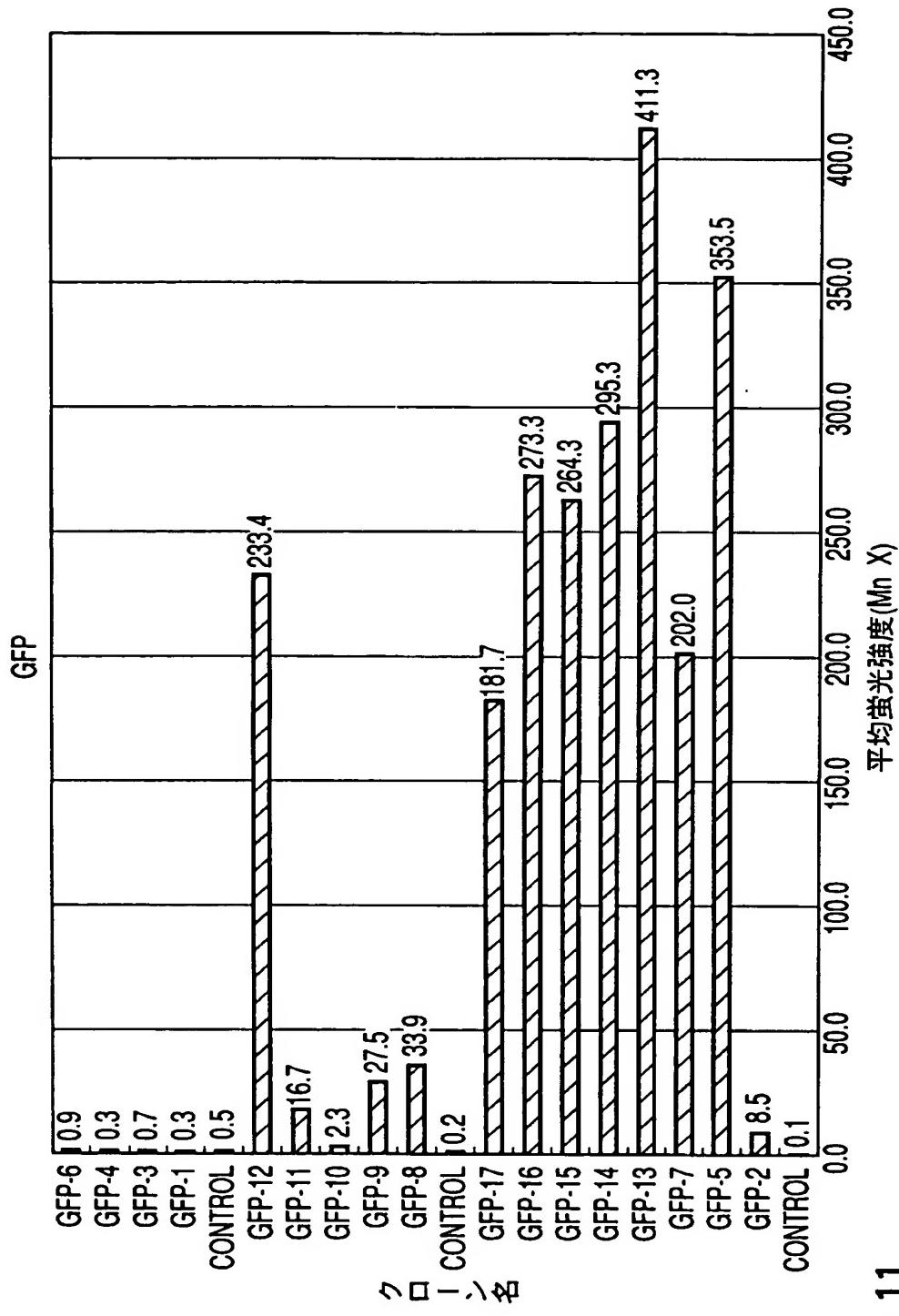


FIG. 11

12/14

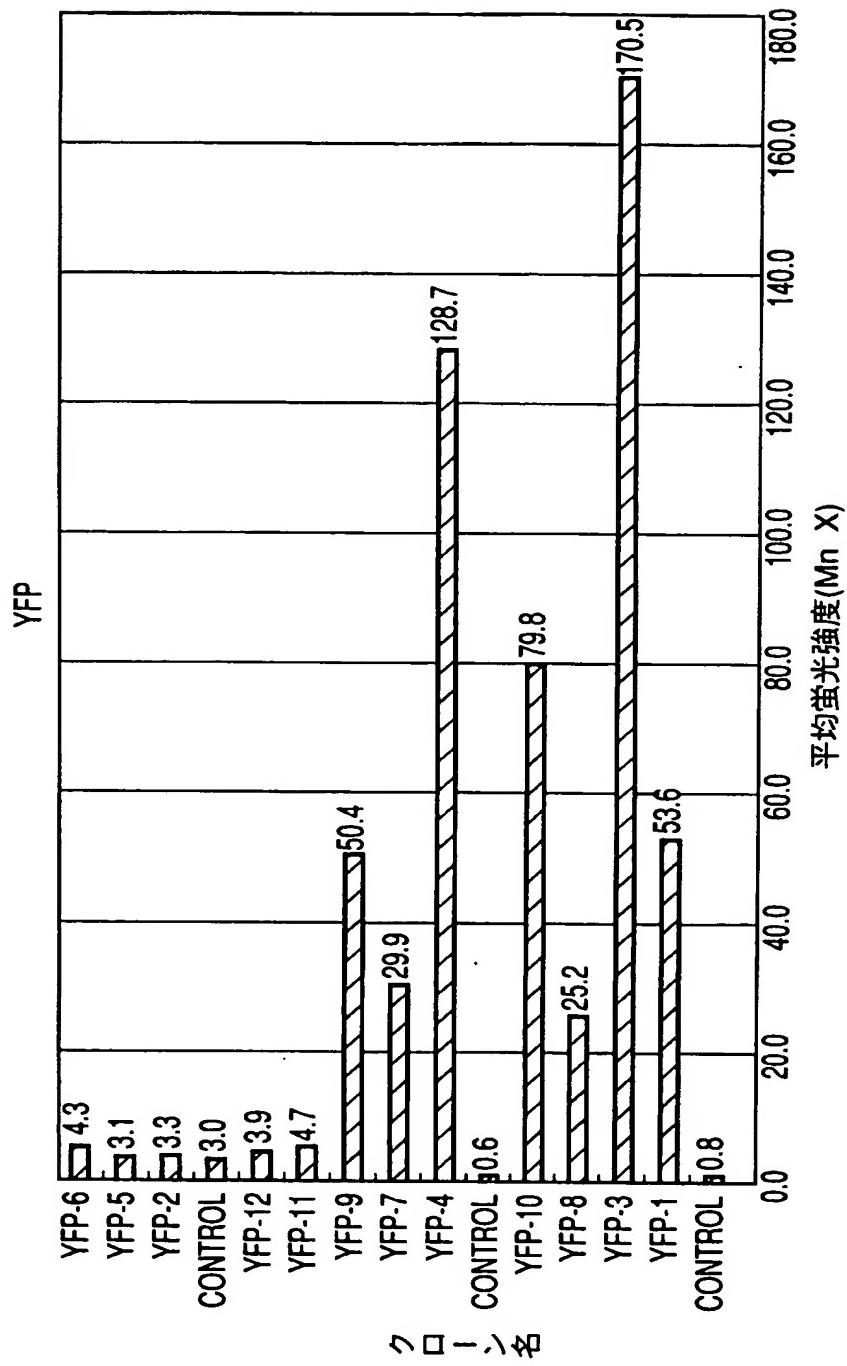


FIG. 12

13/14

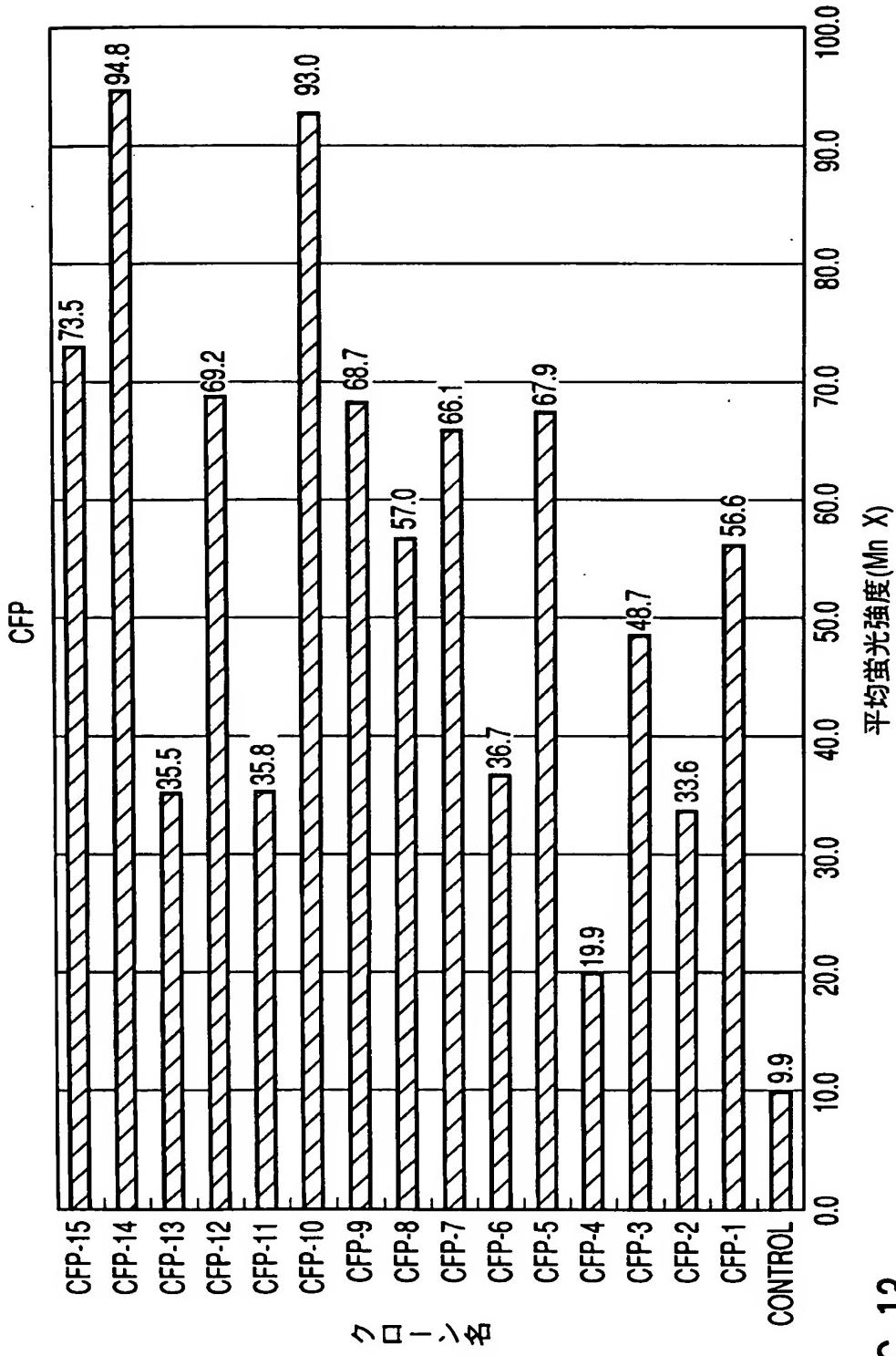


FIG. 13

14/14

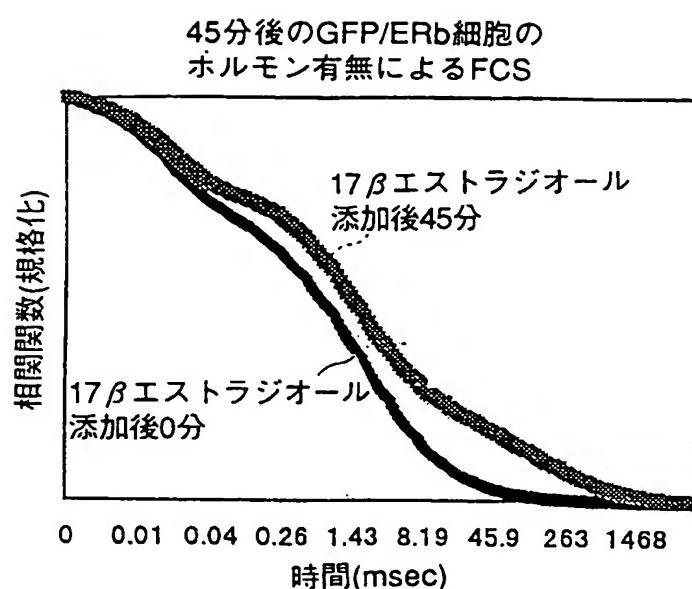


FIG. 14

1/7

## SEQUENCE LISTING

<110> OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.

<120> Method for testing a substance interacting with hormone receptor.

<130> 00S0496P

<150> JP/11-209860

<151> 1999-07-23

<150> JP/2000-163475

<151> 2000-05-31

<150> JP/2000-163476

<151> 2000-05-31

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1740

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(1688)

2/7

&lt;400&gt; 1

gttgcacgccc attatacttg cccacgaatc tttgagaaca ttataatgac ctttgtgcct 60

cttcttgcaa ggtgtttct cagcttttat ctcaagac atg gat ata aaa aac tca 116

Met Asp Ile Lys Asn Ser

1 5

cca tct agc ctt aat tct cct tcc tcc tac aac tgc agt caa tcc atc 164

Pro Ser Ser Leu Asn Ser Pro Ser Ser Tyr Asn Cys Ser Gln Ser Ile

10 15 20

tta ccc ctg gag cac ggc tcc ata tac ata cct tcc tcc tat gta gac 212

Leu Pro Leu Glu His Gly Ser Ile Tyr Ile Pro Ser Ser Tyr Val Asp

25 30 35

agc cac cat gaa tat cca gcc atg aca ttc tat agc cct gct gtg atg 260

Ser His His Glu Tyr Pro Ala Met Thr Phe Tyr Ser Pro Ala Val Met

40 45 50

aat tac agc att ccc agc aat gtc act aac ttg gaa ggt ggg cct ggt 308

Asn Tyr Ser Ile Pro Ser Asn Val Thr Asn Leu Glu Gly Gly Pro Gly

55 60 65 70

cgg cag acc aca agc cca aat gtg ttg tgg cca aca cct ggg cac ctt 356

Arg Gln Thr Thr Ser Pro Asn Val Leu Trp Pro Thr Pro Gly His Leu

75 80 85

tct cct tta gtg gtc cat cgc cag tta tca cat ctg tat gcg gaa cct 404  
Ser Pro Leu Val Val His Arg Gln Leu Ser His Leu Tyr Ala Glu Pro

90 95 100

caa aag agt ccc tgg tgt gaa gca aga tcg cta gaa cac acc tta cct 452  
Gln Lys Ser Pro Trp Cys Glu Ala Arg Ser Leu Glu His Thr Leu Pro

105 110 115

gta aac aga gag aca ctg aaa agg aag gtt agt ggg aac cgt tgc gcc 500  
Val Asn Arg Glu Thr Leu Lys Arg Lys Val Ser Gly Asn Arg Cys Ala

120 125 130

agc cct gtt act ggt cca ggt tca aag agg gat gct cac ttc tgc gct 548  
Ser Pro Val Thr Gly Pro Gly Ser Lys Arg Asp Ala His Phe Cys Ala

135 140 145 150

gtc tgc agc gat tac gca tcg gga tat cac tat gga gtc tgg tcg tgt 596  
Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys

155 160 165

gaa gga tgt aag gcc ttt ttt aaa aga agc att caa gga cat aat gat 644  
Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp

170 175 180

tat att tgt cca gct aca aat cag tgt aca atc gat aaa aac cgg cgc 692  
Tyr Ile Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg

185 190 195

aag agc tgc cag gcc tgc cga ctt cgg aag tgt tac gaa gtc gga atg 740

Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met

200

205

210

gtg aag tgt ggc tcc cgg aga gag aga tgt ggg tac cgc ctt gtc cgg 788

Val Lys Cys Gly Ser Arg Arg Glu Arg Cys Gly Tyr Arg Leu Val Arg

215

220

225

230

aga cag aga agt gcc gac gag cag ctg cac tgt gcc ggc aag gcc aag 836

Arg Gln Arg Ser Ala Asp Glu Gln Leu His Cys Ala Gly Lys Ala Lys

235

240

245

aga agt ggc ggc cac gcg ccc cga gtc cgg gag ctg ctg ctg gac gcc 884

Arg Ser Gly Gly His Ala Pro Arg Val Arg Glu Leu Leu Leu Asp Ala

250

255

260

ctg agc ccc gag cag cta gtc ctc acc ctc ctg gag gct gag ccg ccc 932

Leu Ser Pro Glu Gln Leu Val Leu Thr Leu Leu Glu Ala Glu Pro Pro

265

270

275

cat gtc ctg atc agc cgc ccc agt gcg ccc ttc acc gag gcc tcc atg 980

His Val Leu Ile Ser Arg Pro Ser Ala Pro Phe Thr Glu Ala Ser Met

280

285

290

atg atg tcc ctg acc aag ttg gcc gac aag gag ttg gta cac atg atc 1028

Met Met Ser Leu Thr Lys Leu Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile

295

300

305

310

5/7

agc tgg gcc aag aag att ccc ggc ttt gtg gag ctc agc ctg ttc gac 1076  
Ser Trp Ala Lys Lys Ile Pro Gly Phe Val Glu Leu Ser Leu Phe Asp  
315 320 325

caa gtg cgg ctc ttg gag agc tgt tgg atg gag gtg tta atg atg ggg 1124  
Gln Val Arg Leu Leu Glu Ser Cys Trp Met Glu Val Leu Met Met Gly  
330 335 340

ctg atg tgg cgc tca att gac cac ccc ggc aag ctc atc ttt gct cca 1172  
Leu Met Trp Arg Ser Ile Asp His Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Pro  
345 350 355

gat ctt gtt ctg gac agg gat gag ggg aaa tgc gta gaa gga att ctg 1220  
Asp Leu Val Leu Asp Arg Asp Glu Gly Lys Cys Val Glu Gly Ile Leu  
360 365 370

gaa atc ttt gac atg ctc ctg gca act act tca agg ttt cga gag tta 1268  
Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Thr Ser Arg Phe Arg Glu Leu  
375 380 385 390

aaa ctc caa cac aaa gaa tat ctc tgt gtc aag gcc atg atc ctg ctc 1316  
Lys Leu Gln His Lys Glu Tyr Leu Cys Val Lys Ala Met Ile Leu Leu  
395 400 405

aat tcc agt atg tac cct ctg gtc aca gcg acc cag gat gct gac agc 1364  
Asn Ser Ser Met Tyr Pro Leu Val Thr Ala Thr Gln Asp Ala Asp Ser  
410 415 420

6/7

agc cgg aag ctg gct cac ttg ctg aac gcc gtg acc gat gct ttg gtt 1412

Ser Arg Lys Leu Ala His Leu Leu Asn Ala Val Thr Asp Ala Leu Val

425

430

435

tgg gtg att gcc aag agc ggc atc tcc tcc cag cag caa tcc atg cgc 1460

Trp Val Ile Ala Lys Ser Gly Ile Ser Ser Gln Gln Gln Ser Met Arg

440

445

450

ctg gct aac ctc ctg atg ctc ctg tcc cac gtc agg cat gcg agt aac 1508

Leu Ala Asn Leu Leu Met Leu Leu Ser His Val Arg His Ala Ser Asn

455

460

465

470

aag ggc atg gaa cat ctg ctc aac atg aag tgc aaa aat gtg gtc cca 1556

Lys Gly Met Glu His Leu Leu Asn Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro

475

480

485

gtg tat gac ctg ctg gag atg ctg aat gcc cac gtg ctt cgc ggg 1604

Val Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asn Ala His Val Leu Arg Gly

490

495

500

tgc aag tcc tcc atc acg ggg tcc gag tgc agc ccg gca gag gac agt 1652

Cys Lys Ser Ser Ile Thr Gly Ser Glu Cys Ser Pro Ala Glu Asp Ser

505

510

515

aaa agc aaa gag ggc tcc cag aac cca cag tct cag tgacgcctgg 1698

Lys Ser Lys Glu Gly Ser Gln Asn Pro Gln Ser Gln

520

525

530

7/7

ccctgaggtg aactggcca cagaggtcac aagctgaagc gt 1740

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gtgcctcttc ttgcaaggta tt 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tcagcttgtg acctctgtgg 20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04930

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' G01N33/68, C12N15/09, C12Q1/68, G01N15/00, G01N21/78, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' G01N33/68, C12N15/09, C12Q1/68, G01N15/00, G01N21/78, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 9323431, A1 (Baylor College of Medicine), 25 November, 1993 (25.11.93) & JP, 7-509694, A & US, 5364791, A & EP, 745121, A1	1-29
A	EP, 264185, A (Baylor College of Medicine), 01 July, 1988 (01.07.88) & JP, 63-158462, A	1-29
A	WIDENGREN, J., et al., "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and cell surfaces", Cellar and Molecular Biology (1998), Vol.44, No.5, p.857-879	1-29

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 September, 2000 (27.09.00)Date of mailing of the international search report  
10 October, 2000 (10.10.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/04930

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' G01N33/68, C12N15/09, C12Q1/68, G01N15/00, G01N21/78, G01N33/566

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' G01N33/68, C12N15/09, C12Q1/68, G01N15/00, G01N21/78, G01N33/566

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDJB, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 9323431, A1 (Baylor College of Medicine) 25.11月.1993 (25.11.93) &JP, 7-509694, A &US, 5364791, A &EP, 745121, A1	1-29
A	EP, 264185, A (Baylor College of Medicine) 1.7月.1988 (01.07.88) &JP, 63-158462, A	1-29
A	WIDENGREN, J., et al., "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and cell surfaces", Cellular and Molecular Biology (1998) Vol. 44, No. 5, p. 857-879	1-29

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

27.09.00

## 国際調査報告の発送日

10.10.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

小暮道明

4B 9358



電話番号 03-3581-1101 内線 3448